



UNIVERSIDAD DE CANTABRIA - IDIVAL

Facultad de Medicina

Departamento de Biología Molecular

Terapia contra el cáncer
basada en la biomimética de los nanotubos
de carbono con los filamentos celulares

Directora: Mónica López Fanarraga

Tesis doctoral presentada por **Lorena García Hevia**
para optar al grado de doctor por la Universidad de Cantabria

Santander, 2016

Dña. **MÓNICA LÓPEZ FANARRAGA**, Profesora Titular del
Departamento de Biología Molecular de la Universidad de Cantabria,

CERTIFICA: Que Dña. **Lorena García Hevia** ha realizado bajo mi dirección
el presente trabajo de Tesis Doctoral titulado: “Terapia contra el cáncer basada en la
biomimética de los nanotubos de carbono con los filamentos celulares”.

Considero que dicho trabajo se encuentra terminado y reúne los requisitos
necesarios para su presentación como Memoria de Doctorado al objeto de poder
optar al título de Doctor por la Universidad de Cantabria.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, expido el presente certificado
en Santander, a 15 de Junio del 2016.

Fdo. Mónica López Fanarraga

Esta Tesis ha sido financiada gracias a:

- Proyecto de investigación PI13/01074, AES 2013. Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad. Fondos FEDER.
- Instituto de investigación Marqués de Valdecilla (IDIVAL).

AGRADECIMIENTOS

Decía André Lwoff que “el arte del investigador es, ante todo, encontrar un buen jefe”. En pro de manifestar mi total conformidad con esta cita, me gustaría comenzar los agradecimientos por esa figura, la del buen jefe, que se personifica en mi directora de tesis la Dra. Mónica López Fanarraga. Gracias por TODO. Por tu confianza en mí, tu infinita paciencia y tu completa predisposición a transmitir siempre tus conocimientos. Por contagiarme tu genialidad, entusiasmo e ilusión por la ciencia. Por guiarme a lo largo de esta tesis doctoral y alentarme al mismo tiempo a desarrollar mis propias ideas. Pero sobre todo gracias por tu amistad, tu cariño y tus palabras de aliento.

Gracias a Juan Villegas por sus enseñanzas y consejos, así como su total colaboración. Gracias a Fidel Fernandez por su disponibilidad y su ayuda en innumerables ocasiones. Gracias a Íñigo Casafont y Rafael Valiente por ser unos magníficos evaluadores de esta tesis. Gracias a Jesús González por el trabajo de espectroscopía Raman y sus clases magistrales del mismo. Gracias a Carmen Pesquera por su ayuda en el campo de la química. Muchas gracias al resto de componentes del grupo de Nanomedicina, por todo el esfuerzo con el que juntos hemos logrado grandes retos y por tener siempre unas palabras de ánimo para conmigo.

Gracias a los que han sido mis compañeros de laboratorio, por los buenos momentos compartidos, el apoyo y la amistad. A Begoña Ubilla y a Laura Álvarez, por su paciencia y enseñanzas, y a Gerardo Carranza porque además de esto, siempre consigue ver el lado positivo de las cosas.

Gracias al IDIVAL por su financiación durante estos años, a las compañeras de administración y a Fidel Madrazo del Servicio de Microscopía, por su excelente apoyo técnico.

Finalmente, muchas gracias a mis padres y a mi hermana, a los que dedico esta tesis doctoral, porque lo más importante que tengo es vuestro afecto y apoyo incondicional. ¡¡Muchas gracias!!

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	17
1.1 CÁNCER	17
1.1.1 Características generales del cáncer	17
1.1.2 Terapias antitumorales tradicionales	27
1.2 LOS MICROTÚBULOS COMO DIANA DE AGENTES ANTICANCERÍGENOS	30
1.2.1 Los microtúbulos en el ciclo celular	32
1.2.2 Tubulina	35
1.2.2.1 Estructura del dímero de $\alpha\beta$ -tubulina	35
1.2.3 Estructura de los microtúbulos	36
1.2.4 Polaridad de los microtúbulos	36
1.2.5 Nucleación de los microtúbulos	37
1.2.6 Dinámica microtubular	38
1.2.7 Tubulina como diana farmacológica	39
1.2.7.1 Agentes antitumorales de unión a la tubulina	40
1.2.7.2 Mecanismos de resistencia	43
1.3 NANOMEDICINA	46
1.3.1 Nanomateriales	47
1.3.1.1 Clasificación	51
1.3.1.2 Nanomateriales de Carbono	52
II. OBJETIVOS	59
III. MATERIALES Y MÉTODOS	63
3.1 CULTIVOS CELULARES	65
3.1.1 Líneas celulares y condiciones de cultivo	65
3.1.2 Transferencia genética	66
3.1.3 Viabilidad celular	66
3.1.4 Selección de linajes celulares resistentes a Taxol®	67

3.2 MICROSCOPÍA DE CONTRASTE DE FASES.....	67
3.2.1 Convencional.....	67
3.2.2 Célula viva	67
3.2.2.1 Estudio de la división celular	68
3.2.2.2 Estudio de la migración celular	68
3.3 MICROSCOPÍA DE EPIFLUORESCENCIA.....	69
3.3.1 Inmunofluorescencia	69
3.3.2 Microscopía de epifluorescencia convencional.....	70
3.3.3 Microscopía de epifluorescencia en célula viva.....	70
3.3.3.1 Determinación de la disposición de eje N-centrosomal durante la migración celular	70
3.4 MICROSCOPÍA LÁSER-CONFOCAL	70
3.5 MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN	71
3.6 CITOMETRÍA DE FLUJO	72
3.7 MODELOS ANIMALES Y MANIPULACIONES EXPERIMENTALES	72
3.7.1 Modelos animales.....	72
3.7.2 Generación de tumores.....	73
3.7.2.1 Xenotrasplantes en embrión de pollo <i>ex-ovo</i>	73
3.7.2.2 Alotrasplante en ratones	74
3.7.3 Procesamiento y estudio histológico de los tumores.....	74
3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	74
3.9 NANOTUBOS DE CARBONO.....	74
3.9.1 Procedencia	74
3.9.2 Dispersión y funcionalización.....	75
3.9.3 Análisis de la pureza y características estructurales.....	75
IV. RESULTADOS.....	79
4.1 PLANTEAMIENTO DE TRABAJO	81

4.2 FUNCIONALIZACIÓN DE LOS MWCNTs.....	83
4.3 LOS MWCNTs TIENEN EFECTO CITOTÓXICO EN CÉLULAS CANCERÍGENAS HUMANAS <i>IN VITRO</i>	87
4.4 LOS MWCNTs TIENEN EFECTO ANTIMIGRATORIO EN CÉLULAS CANCERÍGENAS HUMANAS <i>IN VITRO</i>	93
4.5 LOS MWCNTs INTERFIEREN CON LA UBICACIÓN DEL CENTROSOMA Y EN LA TRAYECTORIA DE LAS CÉLULAS	95
4.6 EL MELANOMA COMO MODELO TUMORAL.....	98
4.6.1 Estudios <i>in vitro</i> de las células de melanoma.....	99
4.6.1.1 Los MWCNTs penetran en el interior de las células de melanoma maligno	99
4.6.1.2 Efecto citotóxico en las células de melanoma maligno.....	100
4.6.1.3 Efecto antiproliferativo en células de melanoma maligno	102
4.6.1.4 Efecto antimigratorio en células de melanoma maligno	103
4.7 DESARROLLO DE MODELOS TUMORALES SÓLIDOS.....	104
4.7.1 Tumores de melanoma generados en embriones de pollo <i>ex ovo</i>	105
4.7.2 Tumores de melanoma generados en ratones neonatos.....	107
4.7.2.1 Procedimiento de trasplante	108
4.7.2.2 El tamaño depende de la edad del trasplante y los días de crecimiento	111
4.7.2.3 El modelo tumoral es versátil y reproducible.....	112
4.7.2.4 Los órganos tumorales resultado del trasplante poseen características anatomo- patológicas propias de melanoma malignos.....	113
4.8 LOS MWCNTs INHIBEN LA PROGRESIÓN DEL TUMOR <i>IN VIVO</i>	114
4.8.1 Tratamiento tumoral con MWCNTs en las células malignas.....	114
4.8.2 Tratamiento intratumoral con MWCNTs.....	119
4.9 LOS MWCNTs MUESTRAN EFECTOS ANTINEOPLÁSICOS SINÉRGICOS AL TAXOL®.....	121
4.9.1 Resistencia al taxol® de las células de melanoma maligno	121
4.9.2 Efecto sinérgico de los MWCNTs a la acción del taxol®.....	123
V. DISCUSIÓN.....	125

VI. CONCLUSIONES.....	131
VII. BIBLIOGRAFÍA	135
VIII. ARTÍCULOS	147



I. INTRODUCCIÓN



Introducción

1.1 CÁNCER

El cuerpo humano está compuesto por millones de células vivas, las cuales crecen y se dividen (proliferan) a través del proceso conocido como ciclo celular. Este proceso fisiológico controlado da lugar a dos células hijas a partir de una célula inicial llamada madre. Normalmente, existe un equilibrio entre los procesos que entraña la proliferación de las poblaciones celulares y su muerte (apoptosis), para garantizar la integridad de órganos y tejidos. Alteraciones en este equilibrio conducen a la aparición de numerosas patologías.

El término cáncer integra a un amplio conjunto de síndromes relacionados con muy distintas etiologías, desarrollo y pronóstico, caracterizadas por alteraciones que llevan a la destrucción de estos procesos fisiológicos controlados. Como consecuencia se produce un descontrol en la proliferación, haciéndola anárquica, progresiva y destructiva (Jordan *et al.* 1998). Existen muchos tipos de cáncer, pero todos comienzan cuando células anormales se dividen y crecen sin control en cualquier parte del cuerpo. La causa del cáncer más probable y reconocida es la vejez o el envejecimiento de los tejidos, aunque pueden existir múltiples y variadas, como la genética, el medio ambiente o los hábitos (Colditz *et al.*, 2006).

El cáncer es una de las principales causas de mortalidad en todo el mundo, según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2012 hubo 8,2 millones de muertes relacionadas con el cáncer y unos 14 millones de nuevos casos y se prevé que este número aumente en aproximadamente un 70% en los próximos 20 años. Más del 90% de las muertes se producen como consecuencia de las metástasis, que tiene lugar cuando las células cancerosas se trasladan a otras partes del organismo donde comienzan a crecer y a formar nuevos tumores que remplazan al tejido normal.

1.1.1 Características generales del cáncer

En los últimos años se ha avanzado enormemente en el conocimiento de las bases moleculares del cáncer. La recopilación de toda la información científica disponible llevó a dos investigadores, Hanahan y Weinberg, a identificar la existencia de varias características comunes que adquieren y caracterizan a las células tumorales,

lo que denominan las señales distintivas del cáncer (del inglés *Hallmarks of cancer*) (Hanahan & Weinberg, 2000). En una actualización reciente de su trabajo esta lista de seis signos de identidad del cáncer fue ampliada hasta diez (Hanahan & Weinberg, 2011) (figura 1). A continuación se detallan todas ellas.

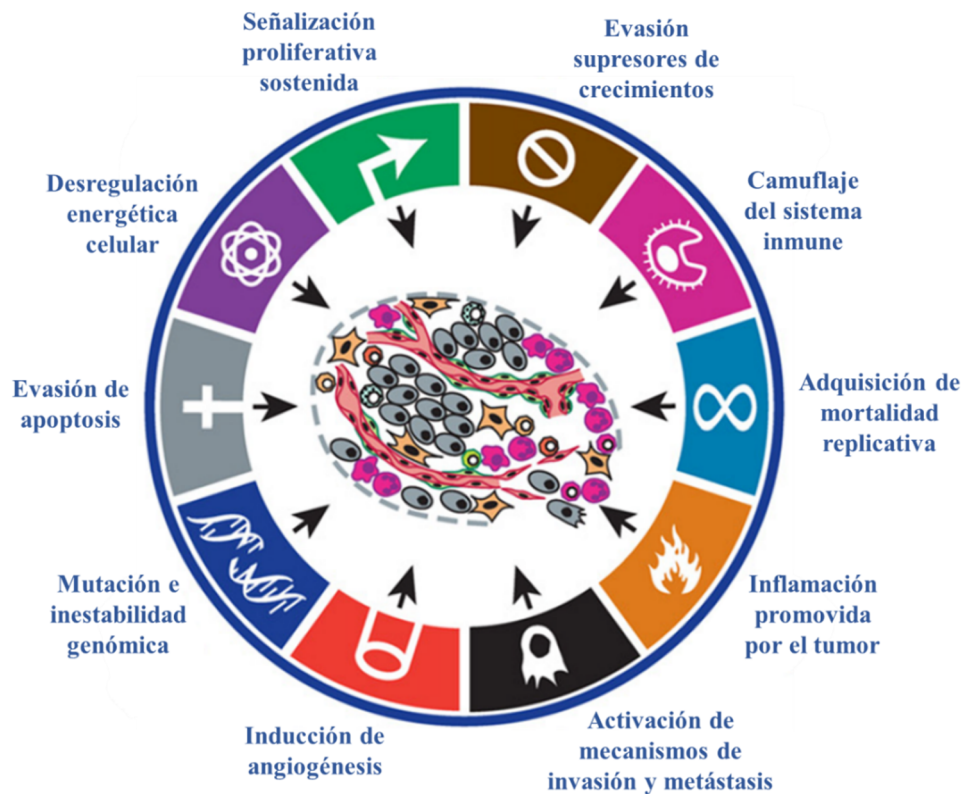


Figura 1. Señales distintivas del cáncer. Adaptación de Hanahan & Weinberg, 2011.

Mutaciones e inestabilidad genómica

Por lo general todas las células de un individuo tienen un número constante de cromosomas. Cuando se producen variaciones que producen cambios a nivel cromosómico (deleciones, traslocaciones, etc) o a nivel de DNA se dice que presenta inestabilidad genómica. Esta situación es una de las marcas distintivas de las células cancerígenas, generando mutaciones aleatorias y/o reordenamientos cromosómicos.

La capacidad de los sistemas de mantenimiento del genoma para detectar y resolver los defectos en el ADN certifican que las tasas de mutaciones espontáneas

sean, por lo general, muy bajas durante cada generación celular. Sin embargo, la mutabilidad en las células cancerígenas es consecuencia de una mayor sensibilidad a agentes mutagénicos, provocado por fallos en uno o varios de los componentes de la maquinaria de mantenimiento genómico. Además, la acumulación de mutaciones se puede acelerar debido a la alteración de los sistemas de vigilancia.

Mantenimiento de la señalización proliferativa

El ciclo celular de las células normales, está estrictamente controlado mediante complejos mecanismos de regulación, existiendo un equilibrio entre genes aceleradores del ciclo y genes supresores. En general, las células tumorales mantienen activados sus genes aceleradores e inhibidos los supresores, lo que les permiten dividirse sin control alguno, posibilitando su permanente estado proliferativo. Los diferentes tejidos controlan la producción y liberación de señales promotoras de crecimiento y división celular mediante factores de crecimiento que se unen a receptores presentes en la superficie celular. Uno de los mecanismos de mantenimiento del estado proliferativo en estas células consiste en la sobre-expresión de receptores de la superficie de membrana para generar una respuesta desmesurada a pequeñas cantidades de factores de crecimiento.

Evasión de las señales supresoras del crecimiento

Las células tumorales acumulan mutaciones en todo el genoma siendo las más importantes a nivel patológico, tanto en los genes supresores de tumores (Van Oijen & Slootweg, 2000) (protooncogen) transformándolos en oncogenes, como en los genes que controlan la proliferación celular (mediante mutaciones de pérdida de función) (Sherr & McCormick, 2002). Estas mutaciones provocan que las células mantengan los mecanismos de división celular activados continuamente y no reaccionen ante estímulos de parada del ciclo celular. Además, las células son estimuladas por señales externas de proliferación que activan receptores de la superficie de las células, lo cual permite la activación de vías de señalización intracelular que regulan el paso a través del ciclo celular, favoreciendo la supervivencia (Hanahan & Weinberg, 2011).

Potencial replicativo ilimitado

Los telómeros son unas estructuras celulares compuestas por repeticiones en tándem de 6 nucleótidos, localizadas en los extremos de los cromosomas, cuya función es evitar la pérdida de información genética relevante como consecuencia del propio mecanismo de replicación del ADN (Blackburn, 1991). La ADN polimerasa no puede copiar las últimas bases del extremo 3' del telómero puesto que necesita espacio para el cebador, debido a lo cual los telómeros se acortan en cada ciclo replicativo. Una longitud crítica de los telómeros activa mecanismos de control y las células entran en un periodo senescente. Esto ocurre en las células normales tras dividirse un número limitado de veces.

El enzima que evita este acortamiento progresivo y mantiene la integridad de los telómeros es la telomerasa. Dicha enzima presenta niveles basales en las células normales diferenciadas, sin embargo, se encuentra sobre-expresada en un alto porcentaje de tumores, por lo que los telómeros se mantienen en los sucesivos ciclos de división celular evitando la entrada en apoptosis celular y manteniendo la capacidad de proliferación ilimitada (Blasco, 2005).

Evasión de la apoptosis

Uno de los mecanismos de control de las divisiones aberrantes que crean inestabilidad genómica es la apoptosis, o la muerte celular programada, que se desencadena en las células como consecuencia de su mal funcionamiento debido a la acumulación de mutaciones irreparables que ponen en peligro la viabilidad funcional y proliferativa. Las células cancerosas presentan mecanismos para evitar la apoptosis inactivando la función de genes proapoptóticos (como Bax o p53), mediante la disminución de la actividad de las caspasas o la modificación de la expresión de las telomerasas.

Desregulación metabólica

En condiciones normales aeróbicas, las células procesan glucosa hasta su degradación completa a CO₂ en la mitocondria. Una de estas adaptaciones de las

células tumorales es el efecto Warburg (Warburg *et al*, 1927) una reprogramación del metabolismo energético hacia la glicolisis a pesar de tener oxígeno disponible. La glicolisis hace referencia a la ruta metabólica que consiste en 10 reacciones enzimáticas consecutivas que convierten la glucosa (compuesto orgánico de seis carbonos) en dos moléculas de piruvato. Se considera a esta vía como clave, o incluso la única en determinados tipos celulares para la obtención de energía. Funciona en ausencia de O₂ (anaerobiosis), y está altamente conservada tanto en el número como en los mecanismos implicados en la mayoría de los organismos. El efecto Warburg expone que las células tumorales se caracterizan por utilizar siempre esta vía de obtención de energía incluso en presencia de oxígeno. Esta alta tasa de glicolisis da como resultado una gran acumulación del ácido láctico que produce una acidosis considerable, lo cual favorece el aumento de mutaciones.

Como esta ruta no es muy eficiente desde el punto de vista energético, la célula tumoral posee varias alteraciones que le conferirían una ventaja selectiva para la supervivencia y proliferación tumoral. En este proceso están implicados reguladores de la expresión génica como el factor 1 inducible por hipoxia HIF-1, el oncogen c-Myc o la proteína supresora de tumores p53 (Yeung *et al*, 2008). HIF-1 incrementa la expresión de los transportadores GLUT1 y GLUT3 (para aumentar los niveles de glucosa disponible en el interior celular), la síntesis de enzimas glicolíticos y la producción de lactato y su transporte al espacio extracelular por inducción de la expresión del enzima lactato deshidrogenasa (LDH) A y del transportador MCT4. Mutaciones en p53 conllevan, entre otras alteraciones, una deficiencia en la función mitocondrial (Hanahan & Weinberg, 2011).

Camuflaje que evita la destrucción por el sistema inmune

El sistema inmunitario se encarga de eliminar cualquier tipo de amenaza que ponga en riesgo el buen estado fisiológico del individuo. Durante los comienzos de la formación de un tumor, las células tumorales no pueden ser diferenciadas morfológicamente de las células del tejido sano en el que se encuentran. Sin embargo, presentan anomalías genéticas y liberan factores quimiotácticos para atraer a células mononucleares, esencialmente linfocitos y macrófagos. Cuando estas células

llegan a la zona tumoral actúan liberando factores de crecimiento y citocinas que refuerzan la señal proliferativa del tumor, dejando de lado la función reparadora para la que están destinadas. Este condicionamiento sobre las células del sistema inmunológico está causado por dos alteraciones importantes en las células tumorales. Una alteración es que estas células modifican o disminuyen la expresión de antígenos necesarios para que sean reconocidas por las células inmunitarias. La otra es que además liberan factores inmunosupresivos que modulan las funciones de las células inmunes e incluso pueden inducir su apoptosis.

Como ejemplo claro está PD1 (del inglés *Programmed Death 1*) que es una proteína inmunomoduladora que se sitúa sobre la superficie de las células T activadoras y en las células B. La interacción entre la PD-1 y su ligando (PD-L1) desactiva las células T. Muchos tipos de células tumorales sobre-expresan este ligando en su superficie, lo cual interrumpe la vigilancia antitumoral de las células T. La interacción entre la PD-1 y el PD-L1 es un mecanismo importante que conduce a la tolerancia inmunológica al cáncer, por lo que el bloqueo de esta interacción puede restituir la vigilancia antitumoral. Así pues, PD-1 se utiliza como diana anticancerígena, ya que existen medicamentos que la bloquean, aumentando la respuesta inmune contra las células tumorales.

La acidosis y la hipoxia activan la angiogénesis

Para mantener un funcionamiento correcto, tanto las células normales como las tumorales requieren un sistema de circulación sanguínea que les permita tanto un aporte de nutrientes y oxígeno como evacuar los desechos metabólicos y el dióxido de carbono. La angiogénesis está regulada por varias vías en las que participan moléculas anti- y pro-angiogénicas que en tejidos normales están en equilibrio. En el tejido tumoral se pierde este equilibrio y se favorece el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos a partir de células precursoras endoteliales (Sun, 2012). El crecimiento tumoral genera hipoxia local que funciona como estímulo para la producción de citoquinas angiogénicas como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, del inglés *Vascular Endothelial Growth Factor*) que es el principal responsable de inducir el

proceso de angiogénesis, que permite la neovascularización o formación de nuevos vasos sanguíneos alrededor del tumor.

Inflamación promovida por el tumor

Los tejidos normales del organismo están compuestos por distintos tipos de células. En los tumores, las células cancerosas interactúan con un conjunto de células que colaboran en el crecimiento tumoral, facilitando el soporte funcional y nutricional necesario y estableciendo lo que se conoce como el microambiente tumoral. Las células de sostén del cáncer pueden llegar a representar hasta más de un 50% del total de las células del tumor (Mesker *et al*, 2007; Gujam *et al*, 2014). Dentro de estas, se encuentran células epiteliales, grasas, fibroblastos anormales y células del sistema inmune innato y adaptativo (Hölzel *et al*, 2013).

A pesar de que las células del sistema inmune son las principales responsables de la inmunovigilancia tumoral, cuando se trata de cáncer, se produce un estado de inflamación crónica mediado principalmente por macrófagos y mastocitos que infiltran el tumor y que producen factores que promueve el crecimiento celular incontrolado. En la célula tumoral se activan factores de transcripción como el NF- κ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas), HIF-1 α (subunidad alfa del factor 1 inducible por hipoxia) y STAT3 (transductor de señal y activador de la transcripción 3). Estos factores de transcripción coordinan la producción de mediadores de la inflamación, citocinas y quimiocinas, así como ciclooxigenasa 2 (COX2) que a su vez genera prostaglandinas como la PGE2, que reclutan y activan leucocitos, macrófagos asociados a tumor y células reguladoras. Las citocinas activan los mismos factores de transcripción en las células inflamatorias, estromales y tumorales llevando a la formación de un microambiente inflamatorio.

La inflamación promueve la iniciación tumoral al generar un estrés genotóxico, el cual favorecen nuevas mutaciones. También participa en la promoción y la progresión tumoral al incrementar la producción de nuevos vasos sanguíneos (neovasculogénesis) alrededor del tumor. Además, favorece la liberación en sangre de células tumorales circulantes que pueden desencadenar metástasis (Qian & Pollard, 2010; Schreiber *et al*, 2011).

Invasión de tejidos y metástasis

La mayor parte de las muertes asociadas a tumores sólidos se deben a la propagación de las células tumorales y el consecuente desarrollo de metástasis. Del tumor primario, solo algunas células adquieren mutaciones que les permite desarrollar el potencial de invadir el tejido que les rodea y posteriormente sitios lejanos (metástasis). Dentro de estas mutaciones, la mejor caracterizada es la que provoca la disminución de la expresión de *cadherina-e* en carcinomas, proteína principal en la adhesión entre células y con la matriz extracelular por lo que las células tumorales pierden el anclaje al epitelio. Las células tumorales con capacidad invasiva cambian su fenotipo haciéndose más parecidas a las células mesenquimáticas, en un proceso denominado transición epitelio-mesénquima. Las células pierden las uniones adherentes, aumentan la expresión de enzimas que degradan la matriz extracelular y aumentan su motilidad, lo que favorece la invasión. Cuando las células normales pierden el contacto con la matriz extracelular o las células vecinas, mueren por anoikis, una forma de muerte celular programada (Gilmore, 2005). Sin embargo, las células tumorales han desarrollado mecanismos para resistir la anoikis y por lo tanto, sobrevivir después de la separación de su matriz y mientras viajan a través de los sistemas linfático y circulatorio. Esta resistencia a la anoikis está relacionada con defectos en la vía del receptor de muerte de activación de la caspasa así como bloqueos en la ruta mitocondrial, como la sobre-expresión de proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2 (Simpson *et al*, 2008).

El proceso de invasión y metástasis se puede esquematizar en una secuencia de pasos que implican una serie de cambios biológicos. A partir del tumor primario, las células comienzan la invasión local, continuando con la intravasación en vasos sanguíneos o linfáticos y el tránsito a través de estas vías, la salida de las células desde estos vasos y la entrada al parénquima de tejidos distantes (extravasación) y concluyendo con la formación de pequeños nódulos de células cancerosas que crecen hasta desarrollar tumores clínicamente detectables (Hanahan & Weinberg, 2011).

Toda esta revisión aborda parte del conocimiento que se tiene sobre la fisiopatología del cáncer y que ha servido para desarrollar una serie de tratamientos para el manejo del cáncer. Se ha permitido el uso de nuevos biomarcadores para el

diagnóstico tumoral gracias a la identificación de moléculas que sólo son expresadas por células cancerígenas. Además, se han descubierto potenciales dianas terapéuticas que son objeto de estudio por parte de la industria farmacológica y tecnológica.

Hipoxia tumoral

Las células tumorales presentan una elevada proliferación y un consumo de nutrientes y oxígeno que supera la capacidad de aporte de los vasos sanguíneos locales existente. Además, los vasos de nueva formación que aparecen debido al proceso de angiogénesis tumoral son muy defectuosos, y esto hace que el flujo sanguíneo sea irregular, haciendo la distribución de oxígeno y nutrientes menos eficiente que la de los tejidos normales. Como resultado, aparecen zonas donde existe un suministro inadecuado de oxígeno (hipoxia) en la mayoría de tumores sólidos (Brizel *et al*, 1999; Lartigau *et al*, 1997), llegando a valores del 3 al 10% respecto a la presión de oxígeno en un tejido normal.

Como resultado de esta hipoxia en el tumor se producen una serie de cambios bioquímicos y tisulares. En la respuesta aguda, tienen lugar modificación post-traducciona de proteínas por reacciones redox, fosforilaciones, etc., y en la respuesta crónica, un cambio en la transcripción de los genes implicados en la adaptación a esta situación, tanto para intentar mejorar la cantidad de oxígeno disponible en la angiogénesis, como para activar la glicólisis y así disminuir el consumo de oxígeno en los procesos de obtención de energía. Además, la hipoxia también es responsable de inducir acidosis a través de un cambio en el metabolismo celular que genera cantidades importante de ácido en el microambiente tumoral. Sin embargo, la hipoxia y la activación de oncogenes también permiten a las células adaptarse a los efectos potencialmente tóxicos de un exceso de acidosis (Chiche *et al*, 2010). Se induce así la sobre-expresión del factor inducible por hipoxia HIF-1, que a su vez aumenta la expresión de un número de sistemas de regulación de pH que hace frente a la acidosis. Su expresión se asocia con un mal pronóstico en los pacientes.

Heterogeneidad tumoral

Cuando se habla de cáncer se hace referencia a varias patologías o síndromes

donde existe una gran heterogeneidad. Además, dentro de un mismo cáncer se puede encontrar una gran heterogeneidad intratumoral (Gerlinger *et al*, 2012), es decir, las células que lo componen presentan distintos fenotipos y genotipos.

La heterogeneidad fenotípica tumoral está condicionada por varios factores. Uno de los más importante son las mutaciones causantes de las alteraciones epigenéticas, es decir, la inestabilidad genómica de la que se ha hablado anteriormente, así como también las diferencias hereditarias. También está condicionada por el tejido en el que se encuentren estas células y los procesos bioquímicos que allí tengan lugar, por lo que otra clave es el microambiente tumoral y cómo las células son capaces de adaptarse a él. La progresión del tumor implica cambios en el microambiente de los tejidos, causando en las células una mayor inestabilidad genética, que a su vez aumenta la diversidad entre las células de un mismo tumor. Así, dos células cancerígenas de un mismo tumor y físicamente cercanas, pueden mostrar genotipos distintos (Marusyk *et al*, 2012; Navin *et al*, 2011).

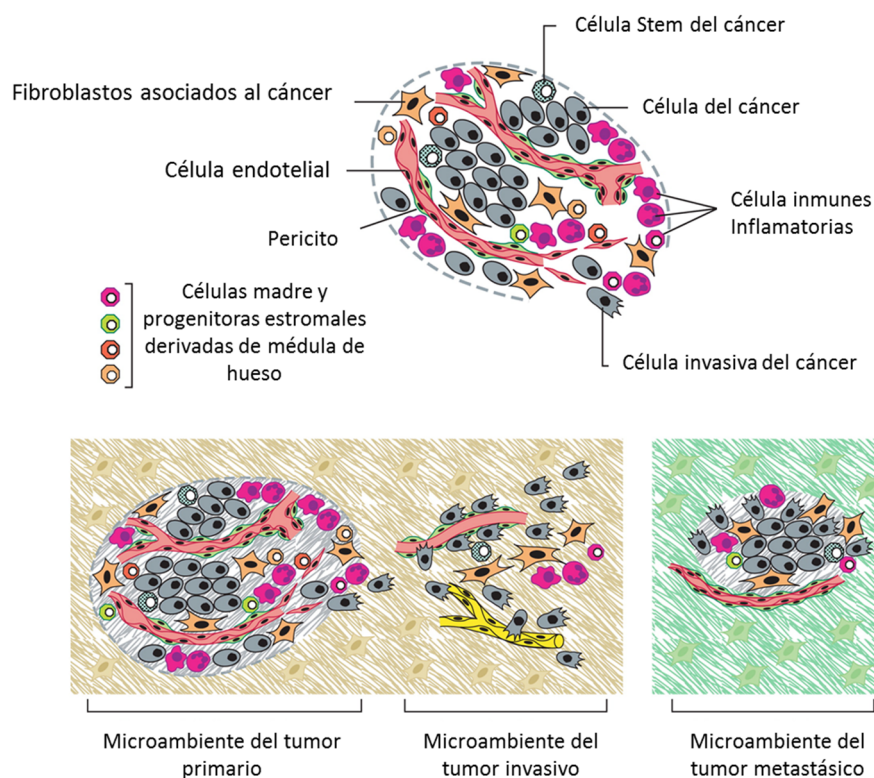


Figura 2. Células del microambiente tumoral. La mayoría de los tumores están formados por un conjunto de distintos tipos celulares que, de forma colectiva, permiten el crecimiento y la progresión tumoral. Los múltiples tipos de células del estroma crean una sucesión de microambientes tumorales que cambian a medida que el tumor invade el tejido o coloniza otros distantes. Adaptación de Hanahan & Weinberg, 2011.

En resumen, se puede decir que la heterogeneidad celular vendrá determinada tanto por la interacción de los factores que sucedan en el interior de la célula como por la del microambiente que les rodea. Además, es tremendamente importante para la expresión de las señales distintivas del cáncer, la localización de las células y las condiciones ambientales, puesto que no se comportarán de igual manera células que se encuentren en el interior tumoral, en condiciones de anoxia, a las que se encuentran en la periferia. A esta heterogeneidad celular en un tumor contribuye la existencia de diversos tipos celulares, incluyendo desde células cancerosas, células normales infiltradas, células endoteliales y pericitos (Hanahan & Weinberg, 2011) (figura 2).

En definitiva, toda esta heterogeneidad tumoral, que abarca desde la molecular hasta la ambiental, supone una nueva fuente de complejidad para su estudio y comprensión, haciendo que los tumores sean considerados como órganos, el denominado “órgano tumoral”. Como consecuencia es necesario un cambio de rumbo en las terapias de ataque.

1.1.2 Terapias antitumorales tradicionales

Actualmente la medicina dispone de varias armas en su lucha contra el cáncer que, lejos de ser excluyentes, se utilizan simultáneamente o secuencialmente (Lake & Robinson, 2005). Hoy en día los tres métodos principales de tratamiento antineoplásico incluyen la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia, aunque existen otros tratamientos que se utilizan en tumores específicos.

Cirugía

Se puede emplear para el diagnóstico y determinación del estado del tumor. Es el caso de las biopsias, donde mediante el estudio de una muestra de tejido canceroso se establece un diagnóstico. En el caso de su aplicación como tratamiento se suele utilizar en la mayoría de tumores sólidos y consiste en la eliminación del tejido dañado. Puede ser suficiente para su total desaparición, (dependiendo del tipo, tamaño o estado) o necesita ser combinada con otra terapia. Por lo general el tumor primario no mata, lo que produce la muerte es la metástasis. Por ello la cirugía es una técnica que se queda corta ya que la extirpación del tumor no basta para su desaparición.

Como se ha descrito anteriormente, las células tumorales tienen el potencial de invadir otros tejidos, de ahí que sean necesarias otras terapias.

Radioterapia

La radioterapia es una práctica médica basada en el empleo de radiaciones ionizantes: rayos X, electrones, protones, etc (Kaplan, 1970). Se utiliza en cáncer para eliminar las células tumorales, mediante el daño en el ADN, impidiendo que crezcan y se reproduzcan (Negrini *et al*, 2010). Aunque, por desgracia, no sólo ataca a las células enfermas, sino también a aquéllas que pertenecen al tejido sano cercano a la zona sometida a la irradiación (Barnett *et al*, 2009).

La radioterapia se puede utilizar como tratamiento principal, como una terapia adyuvante o para reducir los tumores y la presión, el dolor y otros síntomas del cáncer cuando no es posible que la enfermedad desaparezca por completo, la llamada radioterapia paliativa. En algunos casos el objeto de la radioterapia es la destrucción completa de un tumor. En muchos otros se utiliza en combinación con cirugía (Bernier *et al*, 2004), bien para obtener una reducción de la masa tumoral, para facilitar la intervención del cirujano o para prevenir la recurrencia del tumor tras la cirugía.

Quimioterapia

La quimioterapia es una forma de intervención que consiste en el uso de fármacos para destruir las células cancerosas al detener su capacidad de crecer y dividirse (Chabner & Roberts, 2005). Estos fármacos reciben el nombre de antitumorales o antineoplásicos. Su efecto consiste en bloquear la rápida proliferación celular, por lo que estos medicamentos circulan en el torrente sanguíneo y dañan directamente las células que están proliferando en forma activa (Jordan *et al*, 1998). Como en general suelen ser las células cancerígenas las que más crecen y se dividen, son las más susceptibles a la acción de estos fármacos. Sin embargo, no tiene la capacidad de distinguir entre las células sanas y las tumorales, por lo que tiene importantes efectos secundarios destruyendo todas las células que proliferan en el organismo.

La quimioterapia es el tratamiento más común para pacientes con cáncer (Lai *et al*, 2012) y las técnicas utilizadas son:

- Tratamiento citotóxico
- Tratamiento hormonal
- Inmunoterapia

Quimioterapia citotóxica

Como ya se ha comentado, el mayor problema es que estos agentes antimitóticos afectan a los tejidos que experimentan división celular rápida, sin distinción entre célula tumoral o sana. Pese a ello, actualmente, uno de los tratamientos más exitosos se basa en la administración de diversos compuestos químicos con fines terapéuticos. Su efecto citotóxico es inducir la apoptosis ante la aparición de daños irreparables en las células (Fesik, 2005).

Las principales dianas de acción de estos fármacos en la célula son básicamente dos:

- El ADN. Existen agentes que inhiben la síntesis del ADN y también fármacos genotóxicos, que bloquean las células en la fase S del ciclo.
- Los microtúbulos. Agentes que modulan la dinámica microtubular y, en consecuencia, interrumpen la mitosis, bloqueando las células en la fase G2 del ciclo celular (Dumontet & Jordan, 2010) (figura 3).

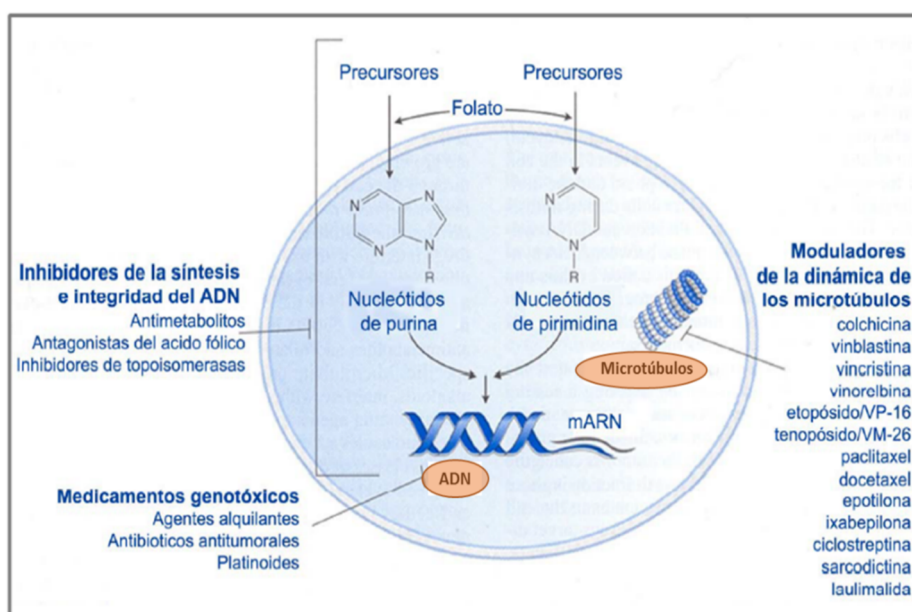


Figura 3. Principales dianas de actuación de los fármacos anticancerígenos (Dawson *et al*, 2001).

1.2 LOS MICROTÚBULOS COMO DIANA DE AGENTES ANTICANCERÍGENOS

Los microtúbulos, junto con los microfilamentos y los filamentos intermedios forman el citoesqueleto. El citoesqueleto es una compleja red de filamentos proteicos que se extienden a lo largo de todo el citoplasma celular.

Todas las células poseen citoesqueleto, de hecho, varios de sus componentes están altamente conservados a lo largo de la evolución, lo cual da una idea de su grado de importancia en la actividad celular. El citoesqueleto desempeña un papel esencial en la polaridad, motilidad y migración celular, en el transporte intracelular así como la posición de los orgánulos y otras estructuras, en la movilidad de los espermatozoides, en el movimiento de los cromosomas durante la división celular y en el mantenimiento de la forma celular (Desai & Mitchison, 1997).

El citoesqueleto está constituido principalmente por tres tipos de filamentos proteicos: los filamentos de actina o microfilamentos, los filamentos intermedios y los microtúbulos, que actúan entre ellos de manera cooperativa a la vez que ejercen funciones individuales.



Figura 4. Esquema ilustrativo de la distribución de los tres tipos de componentes del citoesqueleto de una célula eucariota. Se representan en azul los filamentos intermedios que se anclan a complejos de unión de la membrana plasmática además de rodear al núcleo. En verde los microtúbulos que adoptan una disposición radial a partir del centrosoma y en rojo los filamentos de actina que se encuentran en la corteza celular. Adaptación de Alberts *et al*, 2002.

Los **filamentos de actina** son polímeros proteicos de 5 a 9 nm de diámetro que se encuentran normalmente localizados cerca de la membrana plasmática formando un entramado cortical que sirve de soporte a dicha membrana. Están

formados por monómeros de actina ensamblados en dos cadenas polarizadas, que giran una sobre otra para formar el filamento. Cada subunidad de actina dispone de un sitio de unión a ATP. En presencia de ATP, la actina se polimeriza formando largas hélices dobles, denominadas actina F o actina filamentosa. Tienen un papel muy importante en la motilidad celular y en el control de la forma de la célula (Ridley *et al*, 2003; Pollard & Cooper, 2009). Además, participan en la división celular mediante la formación del anillo contráctil, formado por actina y miosina que se forma alrededor del ecuador celular, por debajo de la membrana plasmática. El estrechamiento de este anillo conlleva la separación de las células hijas.

En asociación con la miosina, los microfilamentos ayudan a generar las fuerzas usadas en la contracción y movimientos celulares básicos. También son constituyentes de estructuras ciliares, del citoesqueleto cortical, de los axones o del anillo contráctil de la célula en división, por lo que son fundamentales en procesos como el desarrollo embrionario, la defensa contra infecciones, la reparación de heridas o la metástasis en células cancerosas (figura 4).

Los **filamentos intermedios** son proteínas filamentosas que forman estructuras muy estables de unos 8-10 nm de diámetro. Dan soporte a los orgánulos y son especialistas en resistir tensiones mecánicas y deformaciones celulares. Están altamente especializados, existiendo tres tipos de familias: filamentos de queratina presentes en las células epiteliales, la vimentina y otros filamentos relacionados con la vimentina, que aparecen en las células del conjuntivo, células musculares y nerviosas, y los neurofilamentos, que se encuentran en las células nerviosas (figura 4).

Los **microtúbulos** son integrantes esenciales de todas las células eucariotas, tienen disposición radial desde el centrosoma celular y juegan un importante papel en muchas y diferentes funciones celulares. Los microtúbulos participan en la localización intracelular de las organelas, son responsables del sostenimiento interno, de los movimientos celulares y del ensamblaje de estructuras como cilios y flagelos, así como de formar un sistema mediante el cual se pueden transportar vesículas (Desai & Mitchison, 1997).

1.2.1 Los microtúbulos en el ciclo celular

El ciclo celular es un conjunto de procesos que conducen al crecimiento celular y la división de una célula madre en dos células hijas. Comprende dos periodos bien definidos: la interfase (G1, S y G2) y la mitosis (M) o división celular (figura 5). Durante todo este ciclo se requiere una maquinaria finamente sintonizada en la que los microtúbulos y su dinámica desempeñan un papel fundamental.

La **interfase** incluye las fases: G1 (del inglés *Growth* o gap1), S (síntesis), G2 (del inglés *Growth* o gap 2) (Norbury & Nurse, 1992). La fase G1 es el periodo que ocurre entre el final de la mitosis y el inicio de la síntesis de ADN. La célula duplica su tamaño debido a la continua síntesis de todos sus componentes. Las células en G1 pueden, antes de pasar a la fase siguiente, entrar en un estado de quiescencia llamado G0, en el que se encuentran la mayor parte de las células que no crecen ni proliferan en el cuerpo humano (Vermeulen *et al*, 2003). La fase S es aquella en la que tiene lugar la replicación del ADN y del centrosoma, cada cromosoma se duplica y el núcleo aumenta de tamaño al contener el doble de ADN. En la fase G2 continúa el crecimiento de la célula mediante la síntesis de ARN y proteínas, hasta que ya está lista para la división (figura 5).

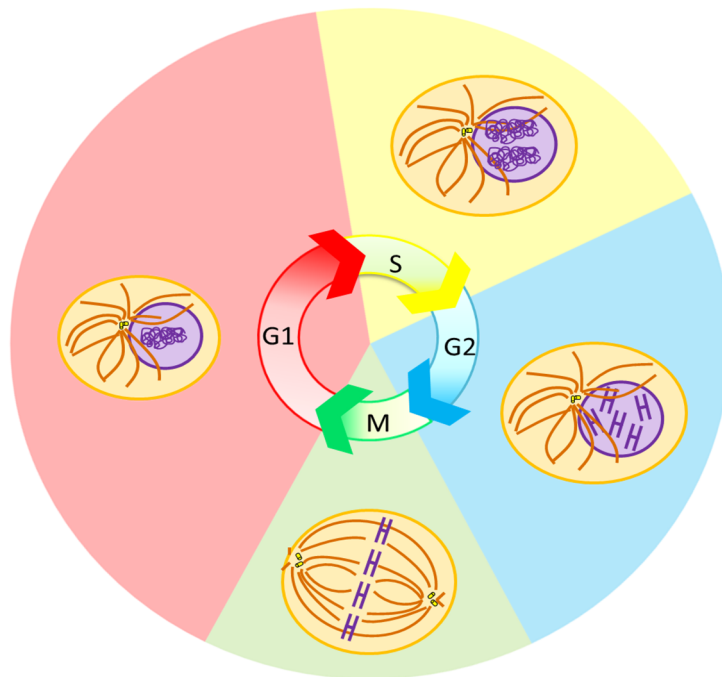


Figura 5. Etapas del ciclo celular. La división celular, tiene lugar después de completarse las tres fases previas que constituyen la interfase: G1, S y G2.

La **mitosis** o división celular es donde se produce la segregación de los cromosomas en dos células hijas. Se considera el inicio de la mitosis (la **profase**) cuando los cromosomas comienzan a condensarse. Estos primeros pasos a menudo pasan desapercibidos hasta que el nuevo centrosoma migra al polo opuesto del núcleo y la membrana nuclear se rompe. A continuación, los cromosomas densamente empaquetados se hacen visibles y los microtúbulos sufren una reorganización masiva. En este punto, la dinámica de los microtúbulos aumenta de 20 a 100 veces con el fin de desmontar la red radial de microtúbulos de interfase y reorganizarse ensamblando el huso mitótico en fases más tardías de la mitosis (metafase) (Desai & Mitchison, 1997; Jordan & Wilson, 2004).

En **metafase** se ensambla el huso mitótico y los cromosomas se mueven para ocupar su posición en la placa ecuatorial gracias a que los microtúbulos mantienen un alargamiento y acortamiento. Así, un huso bipolar se ensambla dejando un centrosoma en cada polo, y los cromosomas visibles en el plano ecuatorial. Al final de esta fase las cromátidas hermanas están unidas entre sí y también a los microtúbulos del huso mitótico. La perfección de esta estructura es absolutamente crucial para garantizar una distribución equitativa cromosómica entre las células hijas.

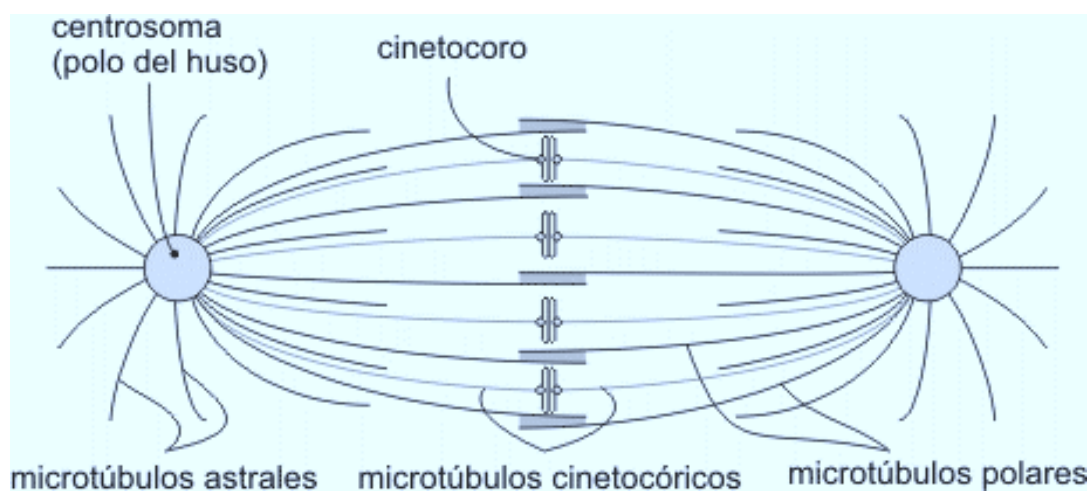


Figura 6. Esquema de los tres tipos de microtúbulos que forman el aparato mitótico.
<http://genomasur.com/lecturas/Guia12b.htm>.

Existen tres tipos de microtúbulos en dicho huso: (i) microtúbulos astrales, irradiando en todas direcciones desde los centrosomas, (ii) microtúbulos polares que interactúan de una manera antiparalela en el ecuador del huso y estabilizan la bipolaridad y (iii) microtúbulos cinetocóricos que se unen al final en el cinetocoro y conectan los cromosomas a los polos del huso (figura 6).

Durante la **anafase** existen dos etapas claramente diferenciadas: **anafase A** y **anafase B**. Durante la anafase A cada cromátida migra hacia cada uno de los polos. El desplazamiento de las cromátidas se debe a que los microtúbulos cinetocóricos se acortan por despolimerización, luego los microtúbulos polares favorecen la separación de las cromátidas y los centrosomas se separan entre sí. En anafase B los microtúbulos del áster contactan con el córtex celular y tiran de los centrosomas, ayudando a la separación de los polos.

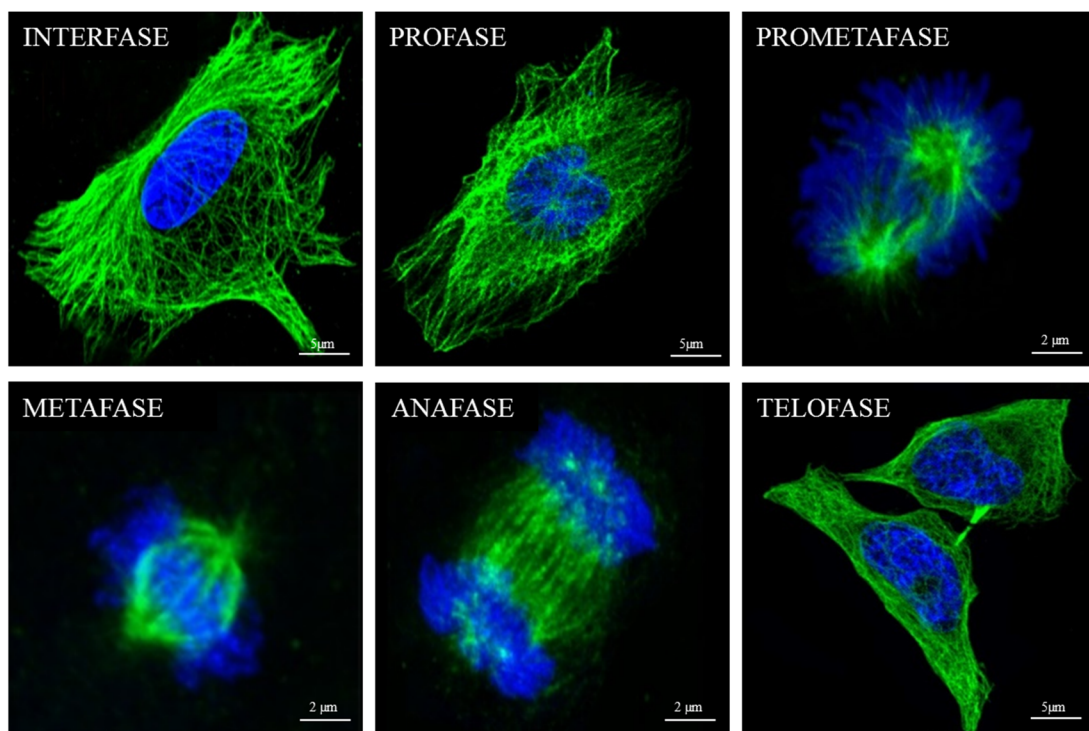


Figura 7. Cambios de los microtúbulos a lo largo del ciclo celular. En interfase, los microtúbulos (verde) se extienden a lo largo de todo el citoplasma de la célula. En prometafase, las envueltas nucleares se han roto, los cromosomas están condensados y los microtúbulos, muy dinámicos, recorren el citoplasma en busca de los cromosomas. En metafase los cromosomas se encuentran en el ecuador de la célula para formar la placa metafásica. En anafase, cada copia de cada cromosoma duplicado se separa y se mueven hacia los polos de la célula. En telofase los cromosomas separados han alcanzado los polos del huso mitótico y la célula madre se está escindiendo para dar lugar a dos células hijas quedando unidas por un cuerpo intermedio y finalmente tiene lugar la citocinesis. El ADN se muestra en azul.

Al final del ciclo, durante la **telofase** los microtúbulos se separan y liberan los cinetocoros produciéndose otra serie de hechos que lleva a la formación de dos células hijas con igual carga genética, finalmente separándose por citocinesis (figura7).

En este ciclo, perfectamente ordenado, existen puntos de control (del inglés *check-points*) cuya finalidad es verificar que se cumplen las condiciones necesarias para permitir el paso de una fase del ciclo a la siguiente, impidiendo que se produzcan daños en el ADN, o también alteraciones en la distribución del número de cromosomas y trasciendan a lo largo del ciclo. La alineación correcta de los cromosomas en la metafase se controla de una forma muy precisa por el llamado punto de control de ensamblaje del huso (SAC, del inglés *spindle assembly checkpoint*). El SAC es un mecanismo de supervivencia que verifica que cada cromátida de cada par de cromosomas esté conectada a su correspondiente centrosoma mediante una red de microtúbulos, garantizando la correcta segregación de los cromosomas (Musacchio & Salmon, 2007). Una vez que todos los cromosomas están correctamente unidos al huso en la placa metafásica se inactiva el SAC. En el caso de no ser así, se impide el avance de la mitosis, el SAC se activa continuamente y desencadena la muerte celular. La eliminación de células que presentan aberraciones en el huso mitótico es un mecanismo que impide la inestabilidad genómica y la aneuploidía (números cromosómicos aberrante), ambos asociados con el cáncer.

1.2.2 Tubulina

La tubulina es una proteína globular de 55 kDa (Krauhns *et al*, 1981; Ponstingl *et al*, 1981) y es el componente principal de los microtúbulos. Pertenece a una de las familias de las GTPasas (proteínas que hidrolizan GTP a GDP) más conservadas a lo largo de la evolución ya que sus miembros juegan un papel crucial en la división celular y mantenimiento del citoesqueleto en eucariotas (Nogales *et al*, 1998).

1.2.2.1 Estructura del dímero de $\alpha\beta$ -tubulina

La tubulina es la unidad estructural del microtúbulo. Consta de un heterodímero compuesto por dos proteínas globulares homólogas, la α y β -tubulina (Ponstingl *et al*, 1981). Cada monómero de tubulina tiene una forma globular

compacta con unas dimensiones de 46 x 40 x 65 Å. Ambas subunidades, α y β , están formadas por dos láminas β de 6 y 4 cadenas, respectivamente, flanqueadas por 12 hélices α . La estructura terciaria de cada monómero está formada por tres dominios bien diferenciados. Un dominio amino-terminal implicado en la unión e hidrólisis de nucleótidos. Un dominio central o intermedio que está involucrado en los contactos longitudinales y laterales entre los monómeros de α y β -tubulina presentes en el protofilamento (Downing, 2000). En el caso de la β -tubulina este dominio conforma el bolsillo de unión a los fármacos estabilizadores de microtúbulos. Por último un dominio carboxilo terminal responsable de la unión a proteínas reguladoras y motoras (Nogales *et al*, 1998). Tanto la α como la β -tubulina muestran una amplia heterogeneidad molecular en sus extremos C-terminales. Esta diversidad es resultado tanto de la expresión de varios genes de diferentes isotipos de tubulinas (Sullivan & Cleveland, 1986) (existiendo seis genes para α -tubulina y siete genes para β -tubulina que codifican proteínas con diferentes secuencias de aminoácidos) (Janke & Bulinski, 2011; Oakley, 2000) como de numerosas modificaciones post-traduccionales que se producen en ambas unidades (MacRae, 1997; Ludueña, 1998).

1.2.3 Estructura de los microtúbulos

Los microtúbulos son polímeros formados por heterodímeros de α y β -tubulina alineados cabeza-cola, donde interacciona la β -tubulina de un dímero con la α -tubulina del dímero siguiente dando lugar a los protofilamentos (Weisenberg, 1972). Trece de estos protofilamentos (Evans *et al*, 1985) se asocian lateralmente para dar lugar al microtúbulo que posee unos 24-25 nm de diámetro externo (Nogales *et al*, 1999) y 15-17 nm de diámetro interno (Amos & Baker, 1979) (figura 8).

1.2.4 Polaridad de los microtúbulos

Esta organización del protofilamento confiere al microtúbulo dos extremos distintos, otorgándole una polaridad al microtúbulo (Walker *et al*, 1988). Por ello, los microtúbulos presentan β -tubulina en un extremo más dinámico del polímero, llamado “extremo más” (+) y α -tubulina en el otro, llamado “extremo menos” (-). Como regla general, el extremo (-) final siempre se encuentra en el centrosoma

polimerizándose a partir del centro organizador de microtúbulos cerca del núcleo, mientras que el extremo (+), mucho más dinámico, se encuentra en la periferia de la célula (Orr *et al*, 2003).

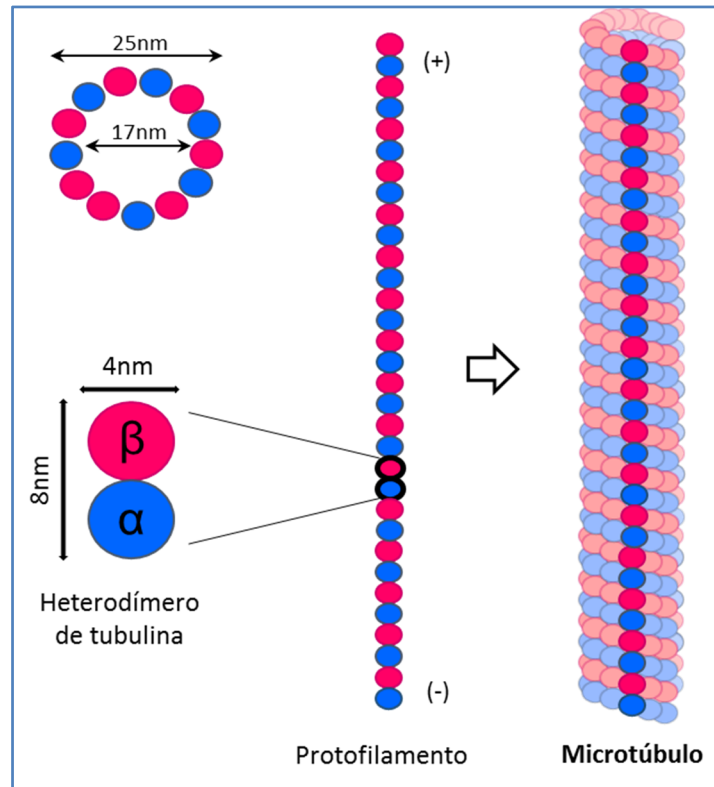


Figura 8. Estructura de los microtúbulos. El heterodímero de tubulina está formado por dos subunidades de tubulina de 4 nm de diámetro cada una, la α -tubulina (azul) y la β -tubulina (rosa), que se asocian de una forma de “cabeza con cola” para formar un protofilamento. La asociación en círculo de 13 protofilamentos da lugar a un microtúbulo con un diámetro exterior de 25 nm e interior de 15 nm.

1.2.5 Nucleación de los microtúbulos

El inicio de la formación del microtúbulo a partir de los heterodímeros de tubulina recibe el nombre de nucleación y tiene lugar en estructuras intracelulares especializadas conocidas como centros organizadores de microtúbulos MTOCs (del inglés, *Microtubule Organizing Center*) (Zheng *et al*, 1995). *In vitro* la nucleación tiene lugar espontáneamente (Mitchison & Kirschner, 1984a) mientras que *in vivo* el principal MTOC en las células animales es el centrosoma aunque la tubulina también puede nuclear en otras estructuras. El centrosoma es un orgánulo celular que controla el número, la orientación y la localización de los microtúbulos en el citoplasma. Está formado por una pareja de centriolos, dispuestos en ángulo recto, embebidos en un

conjunto de agregados proteicos que los rodean y se denomina “matriz pericentriolar” (PCM, del inglés *pericentriolar material*). Los centriolos son estructuras cilíndricas que miden unos 0.25 μm de diámetro y 0.5-0.75 μm de longitud. Cada centriolo está constituido por 9 triplete de microtúbulos formando un cilindro.

1.2.6 Dinámica microtubular

Una de las características principales de los microtúbulos es su comportamiento dinámico, siendo fundamental para todas las funciones que el microtúbulo lleva a cabo en la célula. Cada monómero de α o β tubulina tiene un sitio de unión para GTP. El GTP unido a un monómero de α -tubulina queda físicamente atrapado en la interfase del dímero y no se hidroliza, sin embargo, el unido a β tubulina se puede hidrolizar. En el proceso de polimerización, cuando este dímero se une a un microtúbulo que está creciendo, tiene lugar la hidrólisis del GTP unido a la β -tubulina (Carlier & Pantaloni, 1981). Si la velocidad de adición de dímeros conteniendo GTP al microtúbulo es mayor que la de hidrólisis de GTP, se formará llamada “GTP CAP” y el microtúbulo crecerá en longitud (figura 9). Por el contrario, si predomina la hidrólisis de GTP, existirá un momento en el que el extremo (+) sólo habrá dímeros de tubulina-GDP, desencadenándose la despolimerización abrupta del microtúbulo y la liberación de los dímeros de tubulina-GDP al citosol, proceso que recibe el nombre de catástrofe (figura 9). La β -tubulina de estos dímeros intercambia el GDP por GTP mediante la acción de una proteína intercambiadora de nucleótidos, por tanto, pueden volver a unirse al extremo (+) de otro microtúbulo en crecimiento. Un microtúbulo que se ha despolimerizado puede empezar a crecer de nuevo, proceso que se denomina rescate.

En resumen, se puede decir que los microtúbulos están continuamente alargándose y acortándose. Sin embargo, la población total de microtúbulos puede encontrarse en una tercera fase denominada estado estacionario, donde no hay cambios en la masa total de los polímeros. Así, el estado estacionario se alcanza cuando el crecimiento de un grupo de microtúbulos se compensa con la despolimerización de otro grupo (Mitchison & Kirschner, 1984a, 1984b) y a este equilibrio se le denomina inestabilidad dinámica (figura 9).

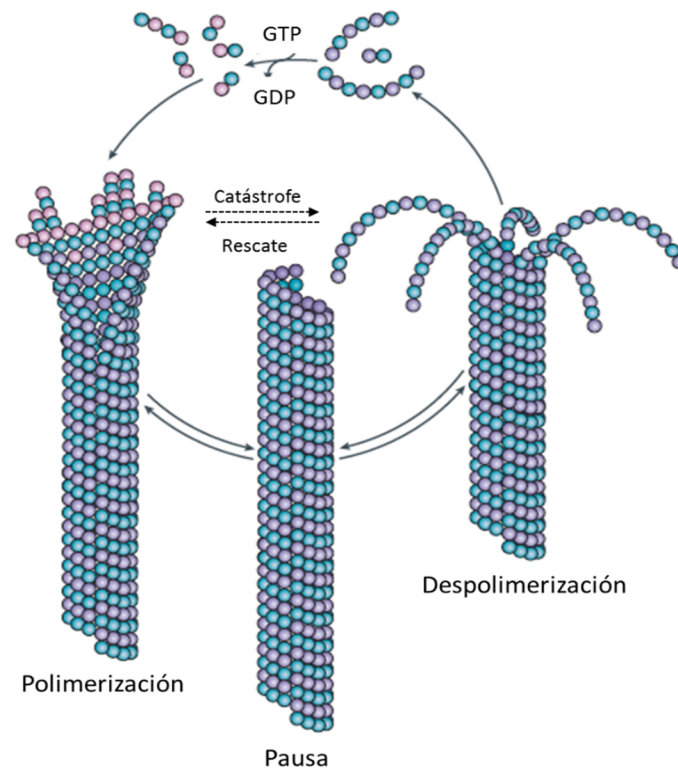


Figura 9. Inestabilidad dinámica de los microtúbulos. La polimerización empieza con la incorporación de dímeros de tubulina. El cierre del extremo genera un microtúbulo en estadio intermedio que puede mantenerse en pausa, antes de someterse a un mayor crecimiento o pasar a la fase de despolimerización. El ciclo de polimerización-despolimerización se completa mediante el intercambio de GDP por GTP, en las subunidades desensambladas de los microtúbulos. Adaptación de Akhmanova & Steinmetz, 2008.

Esta dinámica de los microtúbulos es de crucial importancia para llevar a cabo correctamente las distintas funciones celulares de las que son responsables (Rezania *et al*, 2008). Entre otras, en el mantenimiento de la forma celular, en el transporte de vesículas, mitocondrias y otros componentes de las células, en la migración y división celular, muy especialmente en el proceso de formación del huso mitótico durante la mitosis (Walczak *et al*, 2010), como se ha visto anteriormente, así como en el movimiento de cilios y flagelos.

1.2.7 Tubulina como diana farmacológica

Puesto que la división celular descontrolada es inherente al cáncer y, como se ha visto, los microtúbulos ejercen un papel vital en la mitosis, éstos se han convertido

en diana muy importantes de fármacos antitumorales que actúan alterando su funcionamiento (Dumontet & Jordan, 2010). Desde hace más de 50 años (Noble *et al*, 1958) se viene tratando cualquier tipo de cáncer mediante la interferencia en la maquinaria de los microtúbulos (Jordan 2002; Jordan and Wilson 2004; Matson and Stukenberg 2011; Zhou and Giannakakou 2005), llevando al bloqueo de las células tumorales.

1.2.7.1 Agentes antitumorales de unión a la tubulina

Los fármacos antitumorales, que tienen como diana la tubulina, reciben también el nombre de antimitóticos, citóxicos o disruptores del huso mitótico, ya que tienen efectos inhibitorios sobre la proliferación celular bloqueando la mitosis, al alterar el control preciso que se requiere de la dinámica microtubular durante este proceso. Existen dos familias principales de fármacos dependiendo de su acción sobre los microtúbulos:

- Agentes estabilizadores de microtúbulos o inhibidores de la despolimerización.
- Agentes desestabilizadores de microtúbulos o inhibidores de la polimerización.

Ambos tipos inhiben la correcta alineación de los cromosomas en metafase e interfieren con el ensamblaje del huso, comportándose como venenos del huso mitótico y abortando la mitosis en esta fase del ciclo (Jordan *et al*, 1993). Como hemos visto anteriormente, cuando la mitosis no progresa normalmente, el SAC se mantiene activado de forma continua lo cual desencadena la muerte por apoptosis u otros mecanismos (Jordan and Wilson 2004).

Los agentes **estabilizadores de microtúbulos** inducen el ensamblaje de los microtúbulos e impiden su despolimerización una vez que se ha hidrolizado de GTP a GDP, por lo que reciben el nombre de inhibidores de la despolimerización. Dentro de este grupo se encuentran los **taxanos**: paclitaxel (también llamado taxol®) docetaxel y cabazitaxel. Su mecanismo de acción consiste en unirse a un bolsillo de los microtúbulos, entre el dominio intermedio y el dominio N-terminal de la subunidad de β -tubulina y estar en contacto con el lazo M (Downing, 2000; Nogales *et al*, 1999), al cual inmovilizan favoreciendo la estabilidad de los contactos laterales entre protofilamentos (Li *et al*, 2002) (figura 10). Los microtúbulos ensamblados en

presencia de estos fármacos son cortos, estables y muestran una organización en empalizada en la célula (De Brabander *et al*, 1981). Este hecho da lugar a la formación de husos aberrantes, lo que lleva al bloqueo del ciclo celular en la fase G2/M inhibiendo la proliferación celular (De Brabander *et al*, 1981; Alberti, 2009).

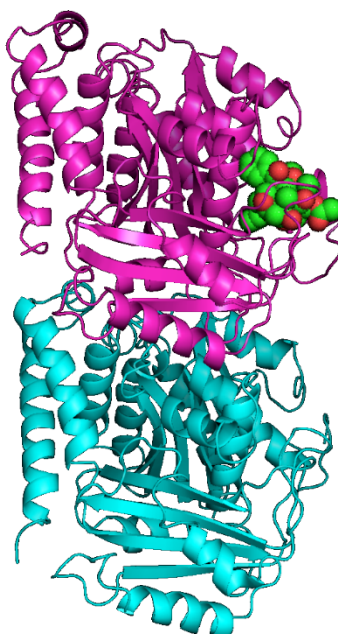


Figura 10. Agente estabilizador de microtúbulos. El paclitaxel (verde), también llamado taxol®, se une a un bolsillo estructural de la β -tubulina (magenta) que se encuentra unida a α -tubulina (azul) formando el heterodímero (García-Hevia *et al*, 2014). Estructura diseñada con el programa Pymol, el número de identificación en el NCBI es 1JFF.

Los taxanos son activos frente a muchos tipos diferentes de tumores, como el cáncer de mama, de esófago y cáncer gástrico, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de ovario, cáncer de pulmón y el cáncer de próstata (Jordan & Wilson, 2004; Montero *et al*, 2005; Gridelli *et al*, 2005; Markman, 2008). Tras el gran éxito cosechado por el paclitaxel en el tratamiento de diversos tipos de cáncer, se han realizado muchos esfuerzos en la búsqueda de nuevos compuestos con actividad similar. Esta búsqueda ha tenido lugar en muy distintas y variadas fuentes, desde corales, esponjas marinas, bacterias o plantas hasta productos de síntesis química. Se descubrió, por ejemplo, que una cepa de *Sorangium cellulosum* producía como metabolito secundario un producto antifúngico llamado epotilona, que ejerce un efecto de estabilización similar al de los taxanos (Gerth *et al*, 1996). Más tarde se descubrieron otros análogos con las

mismas propiedades como son: discodermolida, dictiostatina, sarcodictinas, eleuterobinas, ciertos derivados esteroides, ciclostreptina y tacalonolidas (Alberti, 2013).

Por otro lado, se encuentran los **agentes desestabilizadores de microtúbulos** o inhibidores de la polimerización, entre los que se enmarcan los derivados de colchicina, los alcaloides de la vinca, las dolastatinas, las halicondrinas y su derivado semisintético, así como las espongiostatinas y sus análogos.

Estructuralmente la colchicina está mayoritariamente enterrada en el dominio intermedio de la subunidad β de tubulina, aunque también interacciona con la subunidad α del mismo dímero, lo que produce una desestabilización del dímero de tubulina en una conformación que no permite el establecimiento de los contactos laterales necesarios para formar el microtúbulo (Ravelli *et al*, 2004) (figura 11). La unión de la colchicina a la tubulina conduce a la despolimerización completa de la matriz de microtúbulos, bloqueando de esta manera la división celular, provocando el bloqueo en metafase y la muerte celular (Chen *et al*, 2009).

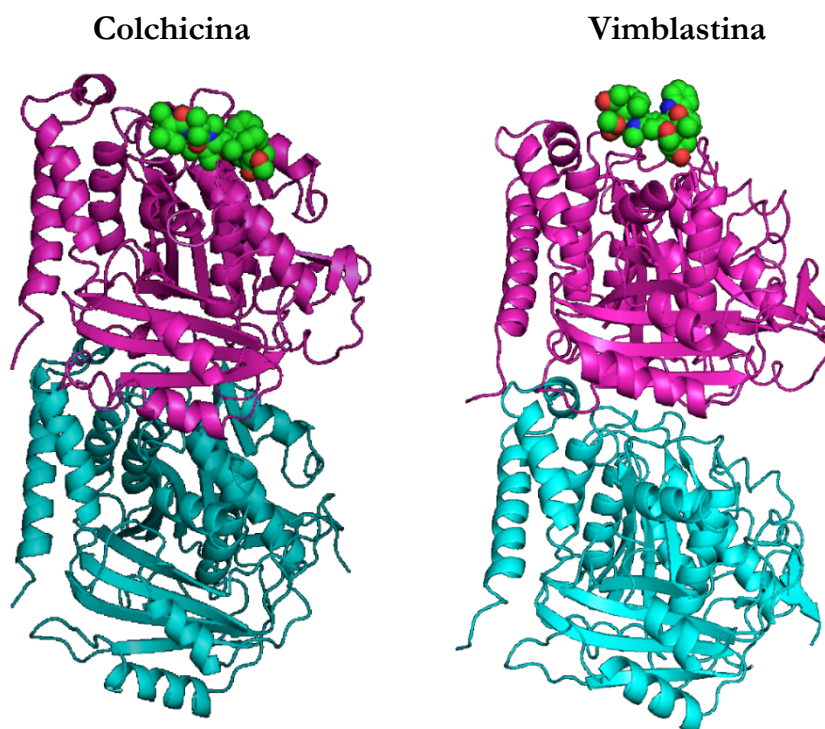


Figura 11. Agentes desestabilizadores de microtúbulos. Esquema del microtúbulo con los fármacos unidos a sus subunidades. La colchicina (izquierda) y la vinblastina (derecha) se unen la β tubulina en una a una región de interacción entre la β de un heterodímero y la α del siguiente, inhibiendo así la polimerización. Adaptación de García-Hevia *et al*, 2014. Estructuras diseñadas con el programa Pymol, los número de identificación en NCBI son: 3E22 y 4I4T respectivamente.

La familia de los alcaloides de la vinca incluye: vinblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina y vinflunina. Estas moléculas también interactúan con la región de interacción dentro de la tubulina, evitando así las uniones del heterodímeros de tubulina. Todas ellas son ampliamente utilizadas como fármacos antineoplásicos, ya sea como agentes únicos o en combinación con otros medicamentos. La vinblastina se une a la β -tubulina despolimerizada (Gigant *et al*, 2005) (figura 11). Esta interacción estabiliza axialmente los protofilamentos curvados que se observan en los microtúbulos despolimerizados con vinblastina (Haskins *et al*, 1981).

1.2.7.2 Mecanismos de resistencia

Pese a que existen todos estos compuestos que se unen a la tubulina e inhiben la mitosis, las células cancerígenas han encontrado varias formas de resistencia a estos fármacos (Harris & Hochhauser, 2009; Perez *et al*, 1993; Stavrovskaya, 2000; Orr *et al*, 2003). De hecho, se ha estimado que este fenómeno contribuye a más del 90% de las muertes por cáncer (Lum *et al*, 1993), por tanto, representa un problema muy grave que puede conducir a la recidiva tumoral e incluso a la muerte. A continuación se repasan los mecanismos de resistencia más destacados (figura 12).

- Mutaciones en el sitio de unión del fármaco a la molécula de tubulina, impidiendo dicha unión (Giannakakou *et al*, 1997; Orr *et al*, 2003). Como se ha explicado con anterioridad la mayoría de los agentes antitumorales se unen a distintas zonas de la estructura de la subunidad β de la tubulina. Cambios puntuales en esas regiones, por ejemplo mutaciones en determinados aminoácidos, pueden llevar a imposibilitar la unión del fármaco y en consecuencia su efecto.

- Modificaciones post-traduccionales de la tubulina que interfieren con la unión de estos fármacos. La diversidad estructural de las tubulinas se incrementa aún más debido a la variedad de mutaciones post-traduccionales. Todas ellas, excepto la acetilación, ocurren en los 20 aminoácidos del extremo C-terminal de las cadenas de α y β -tubulina. Estos cambios afectan a la interacción con las proteínas asociadas a los microtúbulos, modulando así su dinámica y en consecuencia la acción de los fármacos que allí interaccionan (Orr *et al*, 2003) (figura 12b).

- Cambios en la regulación o expresión de proteínas asociadas a microtúbulos. Las proteínas que regulan la dinámica microtubular mediante la interacción con dímeros de tubulina o microtúbulos polimerizados tienen claramente el potencial de modular la sensibilidad de una célula hacia el fármaco. Por ejemplo, la proteína estatmina es una proteína citoplásmica que se une a los dímeros y estimula el desensamblaje de los microtúbulos en respuesta a las necesidades celulares (Belmont & Mitchison, 1996). Esta actividad está regulada por la fosforilación y se pierde cuando la estatmina está completamente fosforilada (Marklund *et al*, 1996), por lo que su sobre-expresión disminuiría la estabilidad de los microtúbulos. Tales cambios en las células cancerosas podrían reducir el efecto de los fármacos estabilizadores y conferir un mecanismo de resistencia a estas drogas (figura 12d).

- Expresión alternativa de otros isotipos de β -tubulina (Sève & Dumontet, 2008). Los isotipos son distintos genes que codifican para una misma proteína. La sobre-expresión de la β -tubulina de clase III, gen que se expresa en neuronas, induce la resistencia a los agentes estabilizadores de microtúbulos (concretamente el paclitaxel). La resistencia tiene lugar de dos formas diferentes: mediante la reducción de la capacidad de este fármaco a suprimir la dinámica de los microtúbulos o aumentando su inestabilidad dinámica en las células resistentes (Kamath *et al*, 2005). Los resultados también sugieren que los reguladores endógenos de la dinámica de microtúbulos pueden interactuar diferencialmente con isotipos de tubulina individuales, apoyando la idea de que la expresión diferencial de isotipos de tubulina tiene consecuencias funcionales en las células.

- Proteínas de resistencia a múltiples drogas (MDR, del inglés *Multiple drug resistance*) que actúan expulsando las drogas al exterior celular y reduciendo así la concentración intracelular de éstas (Bradshaw & Arceci, 1998) (figura 12a).

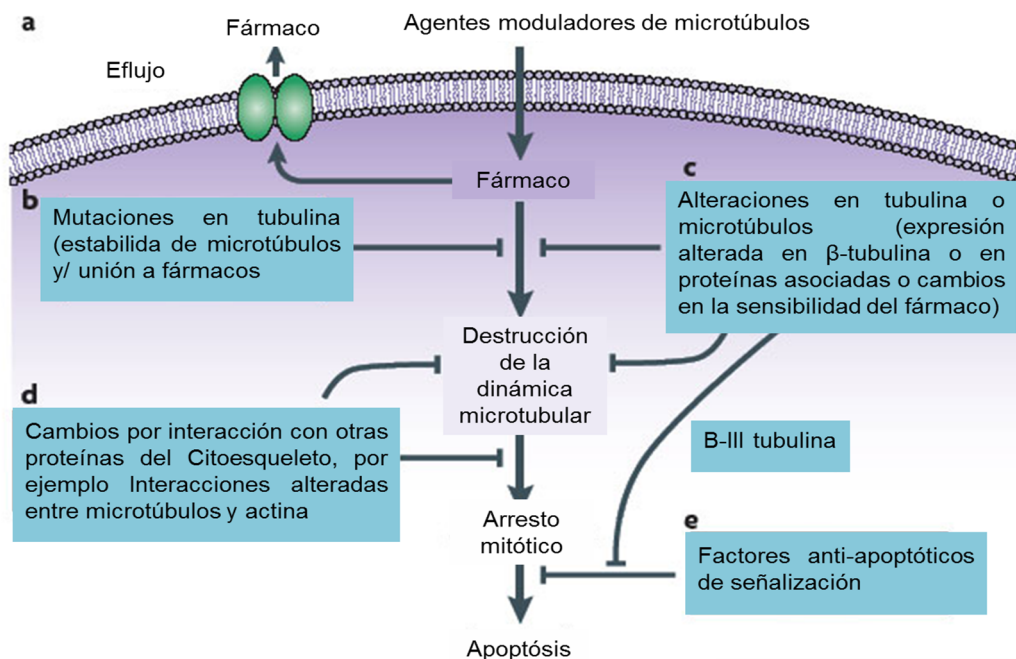


Figura 12. Mecanismos de resistencia a los moduladores del citoesqueleto. La resistencia a estos fármacos es un fenómeno multifactorial y han sido identificados varios mecanismos para los moduladores del citoesqueleto. Estos mecanismos se pueden dividir en cinco categorías. **a)** Disminución en la acumulación intracelular del fármaco por la sobre-expresión de proteínas transportadoras con motivo de unión a ATP. **b)** Alteración directa en la diana del fármaco debida a mutaciones. **c)** Expresión alterada de isotipos de tubulina o de proteínas asociadas a microtúbulos, que reduce la eficacia del fármaco (Verrills & Kavallaris, 2005). **d)** Cambios en los microtúbulos inducidos por la interacción o por la regulación con otras proteínas del citoesqueleto, tales como las proteínas modificadoras de la actina, que pueden afectar a la capacidad de los fármacos de inducir detención mitótica y muerte celular (Po'uha *et al*, 2010; Verrills *et al*, 2006). **e)** Defectos en las vías de apoptosis (Bhalla, 2003). Adaptación de Kavallaris, 2010.

Como se ha visto, los mecanismos tradicionales de combatir el cáncer no son del todo eficientes debido a la resistencia que tienen las células cancerígenas, por lo que urge el buscar nuevas terapias que potencien el efecto o sustituyan a estos fármacos en su lucha contra las células malignas. Los nanomateriales en medicina se postulan como una de las mejores terapias adyuvantes, ya que tienen el potencial de transformar radicalmente los tratamientos antineoplásicos. Estos nuevos tratamientos matan a las células del cáncer empleando estrategias muy diferentes a los fármacos convencionales (Schroeder *et al*, 2012; Farokhzad *et al*, 2006; Sailor & Park, 2012; Dobson, 2012; Bourzac, 2012; Madani *et al*, 2011; Bae *et al*, 2011). Es por ello que el trabajo de esta tesis doctoral se centrará en el estudio del posible uso de nanotubos de carbono como agentes antineoplásicos.

1.3 NANOMEDICINA

El origen de la nanotecnología se atribuye a la conferencia que impartió Richard Feynman, premio Nobel de Física, en California en 1959 que llevaba por título “Hay mucho espacio ahí abajo” (*There is plenty of room at the bottom*) donde consideraba la idea de una nueva ciencia basada en la manipulación directa de los átomos y las moléculas. Sin embargo, el término “nanotecnología” fue utilizado por primera vez por el científico Norio Taniguchi en 1974 (Taniguchi, 1974), definiéndose como la separación, consolidación y deformación de la materia a nivel atómico o molecular.

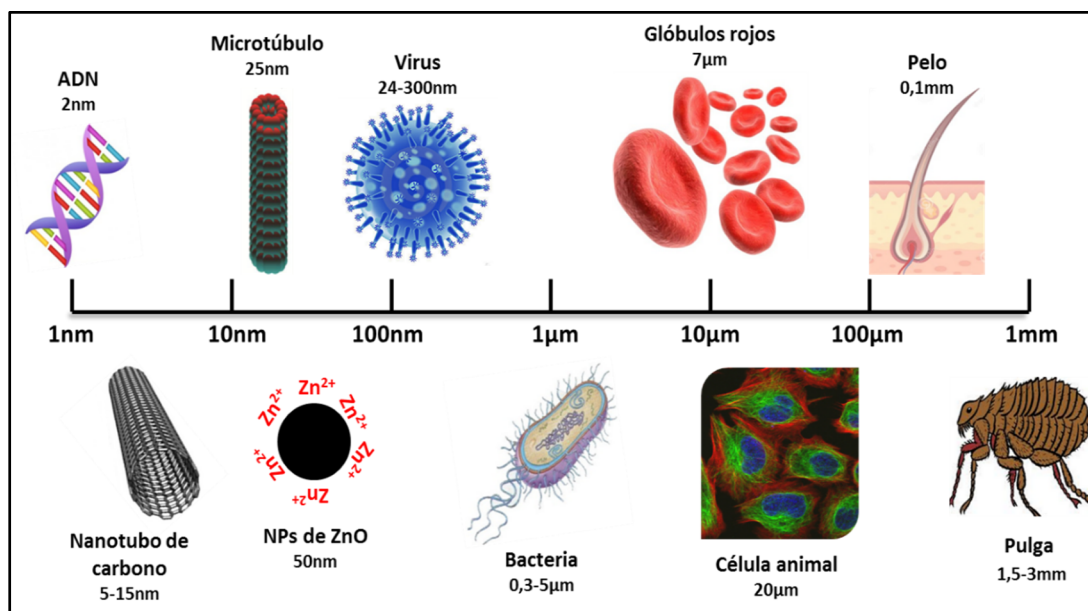


Figura 13. Representación de los diferentes tamaños de estructuras biológicas y nanomateriales. Escala de distintos nanomateriales en el contexto biológico.

La nanociencia es la disciplina encargada del diseño, síntesis, caracterización y aplicación de materiales y dispositivos que poseen al menos una de las dimensiones en escala nanométrica (Boulaiz *et al*, 2011). La unidad de medida es el nanómetro (del latín *nanus*, enano) que equivale a 10^{-9} metros, es decir, una milmillonésima parte del metro. Se puede comprobar en la figura 13 cómo este tamaño se corresponde con el de muchas estructuras biológicas. La nanociencia está teniendo múltiples beneficios debido al enorme potencial de la materia a dicha escala, por lo que, a pesar de tratarse

de una ciencia emergente y clave para el futuro, puede considerarse una realidad del presente.

En 2004 el Instituto Nacional del Cáncer de EEUU firmó la alianza para el uso de la nanotecnología en el cáncer, desarrollando una nueva convergencia entre la nanotecnología y la medicina como campo de investigación multidisciplinar, lo que ha dado lugar a la aparición de una nueva disciplina: la Nanomedicina. Esta rama está alcanzando mucha proyección debido a sus importantes aplicaciones, especialmente en el diagnóstico, prevención y tratamiento de las enfermedades, gracias al trabajo y al conocimiento de expertos en diferentes áreas como ingenieros, físicos, biólogos, químicos y matemáticos (Seigneuric *et al*, 2010).

Las Plataformas Europeas y Española de Nanomedicina agrupan las aplicaciones de la Nanomedicina en tres grandes áreas interrelacionadas entre sí, que son:

- Técnicas analíticas y herramientas de diagnóstico
- Nanoterapia
- Medicina regenerativa

El uso de nanomateriales como diagnóstico consiste en el desarrollo de sistemas analíticos y de imagen para detectar una enfermedad en las etapas más tempranas posibles. La nanoterapia pretende dirigir sistemas de liberación de fármacos de forma activa que contengan elementos de reconocimiento para actuar o transportar y liberar medicamentos exclusivamente en las células o zonas afectadas, intentando minimizar los efectos secundarios y conseguir así un tratamiento más efectivo. Por su parte, la medicina regenerativa tiene como objetivo reparar o reemplazar tejidos y órganos dañados aplicando herramientas nanotecnológicas (Lechuga, 2011).

1.3.1 Nanomateriales

Los nanomateriales se definen como aquellos materiales que tienen al menos unas de sus dimensiones en el rango nanométrico. A pesar del hecho de que no hay

consenso sobre el tamaño mínimo o máximo de un nanomaterial, se ha consensuado que los nanomateriales miden de 1 a 100 nm.



Figura 14. Ejemplo representativo de la relación superficie-volumen (S/V) con respecto al tamaño.

Teniendo en cuenta que a todas aquellas estructuras que tienen nano-dimensiones se les consideran nanomateriales, podemos decir que existen infinitos nanomateriales. Existen nanomateriales desde el origen de los tiempos (como los virus, el DNA o el polvo de los volcanes) aunque sólo desde este último cuarto de siglo ha sido posible modificar las moléculas y estructuras de manera deliberada dentro de este tamaño. La cualidad más importante y sorprendente de los nanomateriales es el cambio que sufren las propiedades físicas y químicas de la materia cuando se trabaja a esta escala: la conductividad eléctrica, el color, la resistencia o la elasticidad, entre otras propiedades, se comportan de manera diferente al material micro-macrométrico, lo que conlleva al desarrollo de nuevas e importantes propiedades.

Una de las propiedades más destacables de estos nanomateriales es su gran relación superficie volumen (figura 14) que propicia la aparición de nuevos efectos mecánico-cuánticos y que hace que todas las características relacionadas con la superficie sean bastante diferentes del mismo material con mayor tamaño.

Nanomateriales en aplicaciones biomédicas

La orientación e interacción de los nanomateriales con órganos, tejidos o células está condicionada por sus **propiedades físico-químicas** como: el tamaño, la forma, la carga superficial, la hidrofobicidad, rugosidad, rigidez, el grado de composición, etc (Kamaly *et al*, 2012) (figura 15).

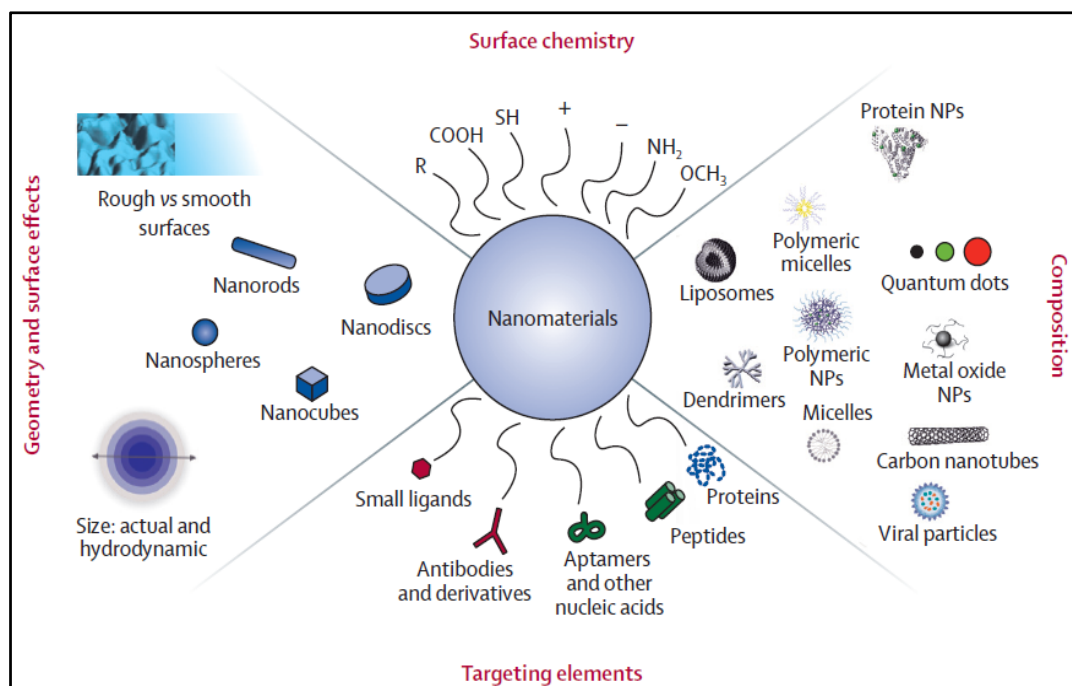


Figura 15. Las características bio-físico-químicas de los nanomateriales son esenciales en su actuación tanto *in vitro* como *in vivo* (Gabizon *et al*, 2014).

El tamaño del nanomaterial es un parámetro clave que afecta a la tasa de captación por parte de la célula (Gratton *et al*, 2008) y también es una propiedad clave para la vida media de circulación *in vivo*. A pesar de que las partículas pequeñas pueden facilitar el proceso de entrada celular, no parece haber ningún límite de tamaño de hasta 5 micras para una correcta internalización celular (Gratton *et al*, 2008). Algunos estudios también han demostrado que la forma del nanomaterial puede ser un factor clave en la internalización por parte de la célula (Gratton *et al*, 2008), ya que dependiendo de su forma los procesos de envoltura por parte de la membrana celular serán más o menos eficaces e influirá en su circulación y biodistribución. Por su parte, la carga superficial del nanomaterial es un factor tremendamente importante

que contribuye a la unión de éste con proteínas y demás compuestos existentes en el medio (Wang *et al*, 2011). De hecho, la modificación superficial de los nanomateriales (funcionalización) es un área de intensa investigación, para conseguir una correcta entrega de éstos en el tejido o célula correspondiente, mediante una unión específica con los receptores celulares. La hidrofobicidad también influye de manera deliberada ya que los nanomateriales que son más hidrófobos que la membrana de la superficie celular son más fácilmente capturados por las células (Zhao *et al*, 2011). Por lo que todas estas características bio-físico-químicas de los nanomateriales son esenciales para su actuación tanto *in vitro* como *in vivo* (figura 15).

Además, los nanomateriales pueden interaccionar con los componentes intracelulares de similares dimensiones rodeándose de una corona de proteínas, que recibe el nombre de biocorona (Sengupta *et al*, 2015), que los camufla en contextos biológicos confiriéndoles una identidad “BIO”. Esta biocorona juega un papel fundamental en la captación celular (Pelaz *et al*, 2015), la acumulación y la biodegradación de los nanomateriales (Saptarshi *et al*, 2013) así como capacidad para mediar o para alterar la respuesta inmune.

Ventajas del uso de nanomateriales en aplicaciones biomédicas

Todas estas características de los nanomateriales les confieren grandes ventajas para su utilización en aplicaciones biomédicas. La principal es que, como ya se ha descrito anteriormente, poseen la misma escala de tamaño que muchas biomoléculas, como receptores, ácidos nucleicos o anticuerpos. Dado que la solubilidad aumenta a medida que disminuye el tamaño de partícula, el tamaño nano les permite una correcta solubilidad y estabilidad en ambiente fisiológico.

Ciertos nanomateriales tienen nuevas propiedades físicas, como por ejemplo las características ópticas de puntos cuánticos que los capacitan para ser utilizados en bio-imagen (Liu *et al*, 2013). El hecho de que tengan una elevada área superficial los hace muy recomendables para el transporte de terapias. Finalmente, a través de procesos de direccionalización pasiva o activa, pueden realizar el proceso de liberación del fármaco de una forma mucho más controlada y reducir procesos de toxicidad y efectos adversos si se compara con fármacos tradicionales (Wang *et al*, 2012).

Nanomateriales en oncología

En la figura 13 se puede observar que el tamaño de los materiales nanométricos se corresponde con el de ciertas macromoléculas biológicas básicas en el funcionamiento de todos los seres vivos, como el ADN o las proteínas, por lo que la interacción entre los componentes del cuerpo humano y los materiales, estructuras o dispositivos creados mediante la nanotecnología, abre las puertas a nuevas posibilidades en medicina. De hecho, se espera que en el campo relacionado con el cáncer estos nanomateriales tengan gran impacto (Schroeder *et al*, 2012; Farokhzad *et al*, 2006; Sailor & Park, 2012; Dobson, 2012; Bourzac, 2012; Madani *et al*, 2011; Bae *et al*, 2011). Su principal ventaja respecto a otros tratamientos antineoplásicos es que no requiere un gen o una proteína sobre la que actuar para destruir la célula, por lo que la resistencia tumoral basada en adaptaciones genéticas que permite evadir la acción de los habituales antineoplásicos no afecta a los nanomateriales.

1.3.1.1 Clasificación

Debido a la infinidad de los nanomateriales existentes, son muchas las clasificaciones que pueden hacerse (desde las basadas en su origen, en su composición, su forma y hasta su dimensión) por lo que resulta muy complicado restringirlo a una sola. No obstante, una de las más utilizadas es la que ha hecho la Agencia de Medio Ambiente de Estados Unidos que a continuación se detalla.

- Nanomateriales basados en carbono: Estos nanomateriales están compuestos mayoritariamente por carbono y suelen adoptar formas como esferas huecas, elipsoides o tubos. Estas partículas tienen muchas aplicaciones posibles, como el desarrollo de recubrimientos, materiales más ligeros y resistentes, así como diversas aplicaciones en el campo de la electrónica y la medicina.

- Nanomateriales basados en metales: Incluyen puntos cuánticos, nanopartículas de oro y plata y óxidos metálicos como el dióxido de titanio, óxido de zinc, etc.

- Dendrímeros: Estos nanomateriales son polímeros de tamaño nanométrico contruidos a partir de unidades ramificadas. La superficie de un dendrímero tiene

numerosos extremos de cadena, que se pueden adaptar para desempeñar funciones químicas específicas. Además, en su interior se pueden introducir otras moléculas como fármacos o similares.

- Compuestos: Los compuestos combinan nanopartículas y/o nanomateriales de mayor tamaño.

- Nanosistemas lipídicos: Incluyen emulsiones, liposomas y nanopartículas lipídicas sólidas. Son ampliamente utilizados para mejorar las propiedades biofarmacéuticas y/o el índice terapéutico de los fármacos.

1.3.1.2 Nanomateriales de Carbono

El carbono es, después del oxígeno, el elemento químico más abundante en la naturaleza y los seres vivos, de ahí que sea uno de los más estudiados. Es fundamental en biología y medicina, así como en la producción de energía y la conservación del medio, además de formar parte de numerosos materiales de gran importancia en nuestra vida cotidiana. Dependiendo de las condiciones de formación, puede encontrarse en la naturaleza en distintas formas alotrópicas, desde el grafito, que utilizamos en las minas de los lápices, constituido por láminas apiladas fáciles de separar, hasta el diamante, de estructura cúbica cristalina. Aunque estos dos compuestos están formados por carbono, tienen distinta estructura atómica lo que les hace completamente diferentes. Este hecho, que resulta bastante sorprendente en un elemento químico, ha llevado al estudio intensificado en los últimos años de los distintos compuestos del grafito.

El grafito es una estructura tridimensional que está formado por láminas de grafeno superpuestas. El **grafeno** es una de estas láminas (bidimensional) formada por multitud de átomos de carbono puro dispuestos en un patrón regular hexagonal que presentan enlaces con altos estados energéticos. Este material es la quinta forma alotrópica del carbono, que presenta propiedades mecánicas, eléctricas y térmicas excepcionales con potenciales usos y aplicaciones, tanto en la ciencia como en biomedicina. Debido a este enorme potencial, en los últimos años ha alcanzado mucho interés, llegando concederse el Premio Nobel de Física a dos investigadores rusos por sus experimentos innovadores en la investigación de este nanomaterial

(Novoselov *et al*, 2004). Si esta lámina de grafeno se enrolla sobre sí misma en forma de cilindro da lugar a los nanotubos de carbono. Si se empaqueta en forma de esfera, como un balón de fútbol, da lugar a los fullerenos, cuyo descubrimiento y posterior estudio les valió a sus descubridores el Premio Nobel de Química (Kroto *et al*, 1985).

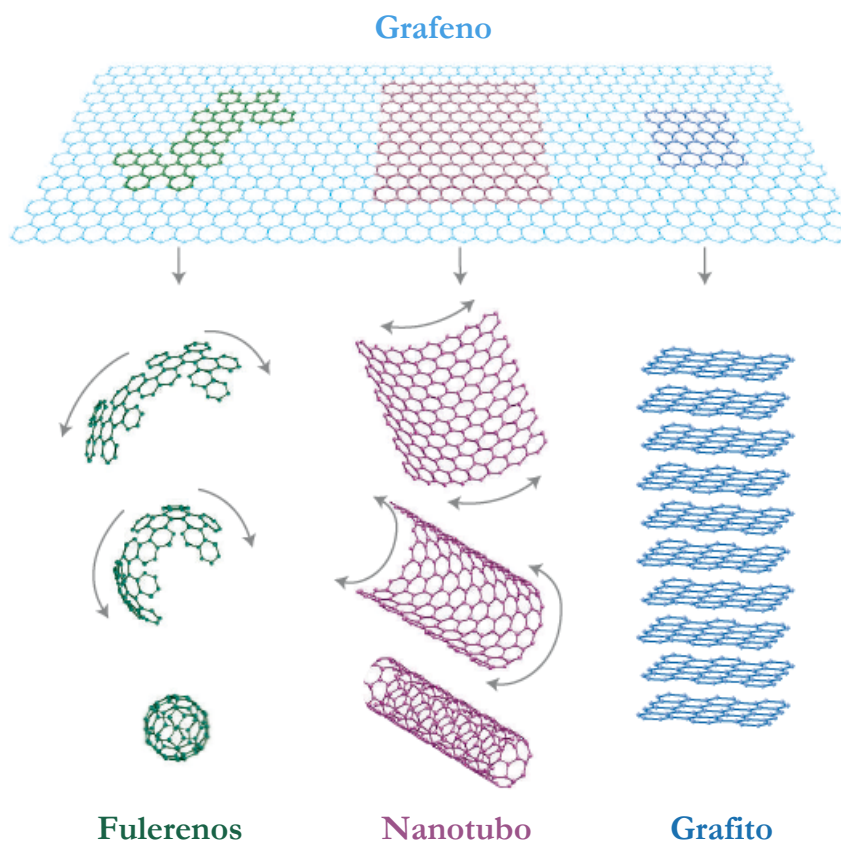


Figura 16. El grafeno, la base de todas las formas gráficas encontradas desde 1985. Puede envolverse en forma de esfera formando los fullerenos, enrollarse en forma de cilindro generando los nanotubos de carbono o apilarse en forma tridimensional conformando el grafito. Adaptación de Geim & Novoselov, 2007.

Los nanomateriales basados en carbono poseen numerosas aplicaciones en la industria, así como en otras muchas disciplinas debido a sus características y potencial. Además, poseen un gran aspecto innovador ya que tienen la habilidad de poder trabajar a escala molecular, átomo a átomo, lo que permite crear grandes estructuras fundamentalmente con una nueva organización molecular. Poseen además propiedades y simetrías únicas que determinan sus potenciales aplicaciones en campos que van desde la electrónica, almacenamiento de energía, sensores o la biomedicina.

1.3.1.2.1 Nanotubos de carbono

A pesar de que existe controversia acerca de cuál es su origen (Monthieux & Kuznetsov, 2006) debido a que ya habían sido producidos y observados bajo una variedad de condiciones desde antes de 1991, es en este año cuando Sumio Iijima, caracterizó por microscopía electrónica de alta resolución una nueva forma alotrópica del carbono (Iijima, 1991), creando así la "revolución científica" que ahora está asociada a ellos. Esta nueva forma alotrópica del carbono, como el diamante, el grafito o los fullerenos, recibe el nombre de nanotubos de carbono. Su morfología se considera que deriva de una lámina de grafeno enrollada sobre sí misma pudiendo modificarse en función de su síntesis o los tratamientos que se les realicen, obteniendo como resultado nanotubos de distinto diámetro o geometría interna.

1.3.1.2.1.1 Tipos de nanotubos de carbono

Existen tres tipos de nanotubos de carbono en función del número de capas: de una sola capa (SWCNTs del inglés *Single-Wall Carbon Nanotubes*), de dos (DWCNTs del inglés *Double-Wall Carbon Nanotubes*) y de varias capas (MWCNTs del inglés *Multi-Wall Carbon Nanotubes*). Los SWCNTs son cilindros formados por láminas aisladas de grafeno que se enrollan sobre sí mismas, con diámetros entre 1 y 2 nm. En el caso de los DWCNTs, son dos láminas las que se pliegan en torno a un eje. Los MWCNTs consisten en varias láminas de grafeno enrolladas en cilindros concéntricos, con espacios de 0,3-0,4 nm entre las capas (Gong *et al*, 2005) (figura 17).

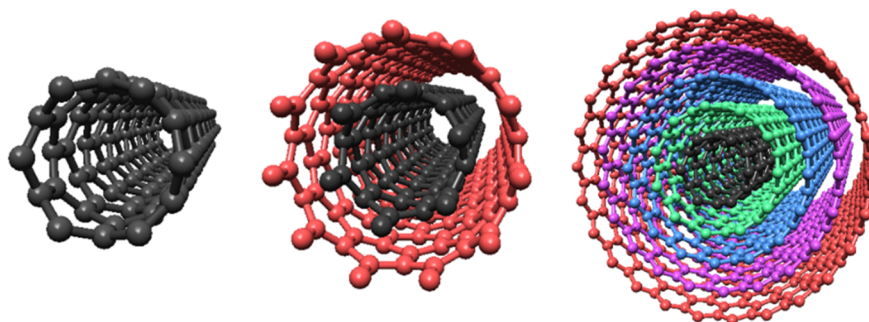


Figura 17. Tipos de nanotubos de carbono en función del número de capas. A la izquierda nanotubo de una sola capa, en el centro de dos y a la derecha nanotubo de varias capas.

Los nanotubos de carbono también se pueden clasificar en tres categorías en función del tipo de enrollamiento de la capa de grafito más externa (Wilder *et al*, 1998), pudiendo ser : butaca, zig-zag o quirales (figura 18).

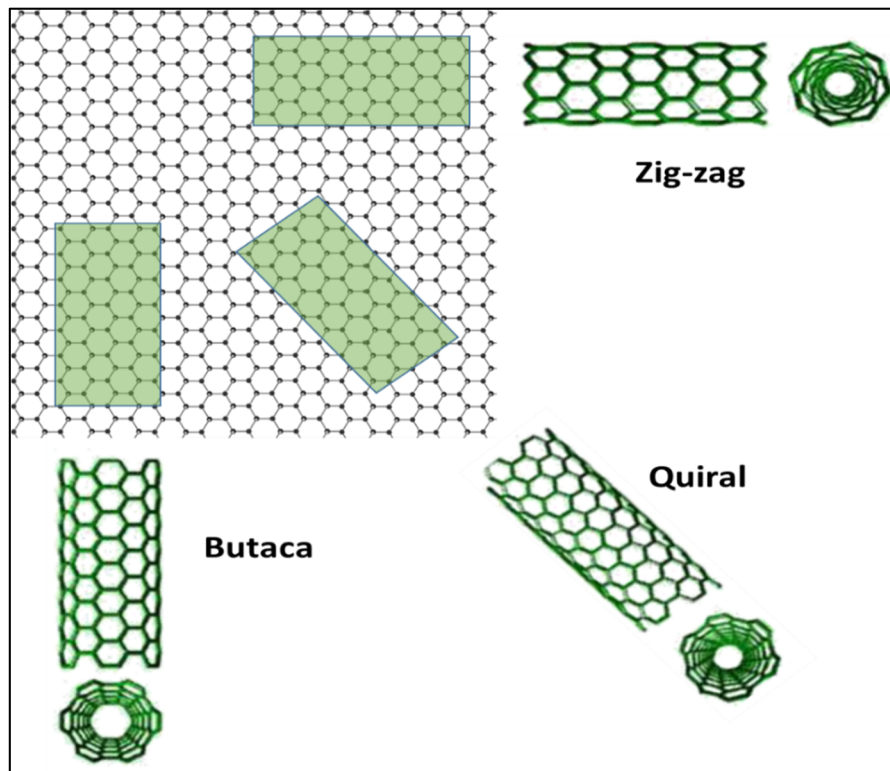


Figura 18. Tipos de nanotubos en función del ángulo enrollamiento de una lámina de grafito. La estructura de un nanotubo viene especificada por su ángulo de quiralidad, que se define por sus dos vectores unitarios (m, n) . Cuando $n=m$ en el caso de una conformación **butaca**, mientras que $m=0$ para una conformación **zig-zag**. En el resto de las estructuras intermedias, donde $0 < |m| < n$, se llaman **quirales** porque pueden existir en dos formas con simetría especular.

1.3.1.2.1.2 Propiedades

El atractivo de los nanotubos reside en sus excelentes propiedades físicas, mecánicas, eléctricas, térmicas y en su reactividad química. Las propiedades de los nanotubos de carbono son muy dependientes de su estructura, que a su vez viene condicionada por el proceso mediante el cual se sintetizaron.

Estos nanomateriales son 2000 veces más finos que un cabello humano y tienen una gran relación superficie/volumen, pudiendo llegar a alcanzar $1300 \text{ m}^2/\text{g}$ (Peigney *et al*, 2001; Flahaut *et al*, 2005). Muestran unas propiedades mecánicas realmente sorprendentes ya que un cable de 2 mm es capaz de soportar 11 toneladas.

La estabilidad de los enlaces entre los átomos de carbono les lleva a ser unas de las fibras más resistentes que existen hoy en día, de hecho, estos materiales se encuentran entre los más elásticos conocidos con una constante de elasticidad seis veces superior a la del acero de altas prestaciones y su resistencia a la tracción que puede alcanzar es más de diez veces la de las fibras más resistentes (Treacy *et al*, 1996). Su capacidad para deformarse y no romperse bajo estrés mecánico, denominada resiliencia, es muy grande.

Tienen una alta conductividad térmica a temperatura ambiente, y son considerablemente estables térmicamente, soportando temperatura de 2800 °C en vacío y 750 °C en presencia de oxígeno. Son grandes conductores de la electricidad, aunque presentan un amplio margen de conductividades, en función de su diámetro, quiralidad y el número de capas de su composición. Los SWCNTs pueden ser semiconductores o conductores en función de su vector quiral. En cambio, los MWCNTs son siempre conductores, ya que en todos los casos alguna de sus capas será de tipo conductor (Hamada *et al*, 1992).

1.3.1.2.1.3 Aplicaciones

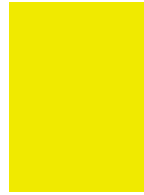
Las propiedades excepcionales que se acaban de describir hacen de los nanotubos de carbono unos excelentes nanomateriales para ser utilizados en múltiples aplicaciones en muy diversos campos. Debido a su gran superficie y su baja resistividad, una de las aplicaciones de mayor futuro es la energía, son perfectos para el desarrollo de supercondensadores (Peng *et al*, 2007; Simon & Gogotsi, 2008; Portet *et al*, 2007) y la fabricación de células solares (Yen *et al*, 2008; Jia *et al*, 2008). Con la necesidad actual de la miniaturización, en el campo de la nano-electrónica los nanotubos de carbono tienen múltiples aplicaciones, especialmente en la fabricación de memorias informáticas (He *et al*, 2006; Jang *et al*, 2008). Gracias a su elevada área superficial y estructura porosa los nanotubos de carbono también han mostrado gran potencial en la adsorción de diversas sustancias químicas (Zhong *et al*, 2009; Kabbashi *et al*, 2009; Yang & Xing, 2009; Bhatia & Myers, 2006). De entre las múltiples aplicaciones de los nanotubos de carbono, cabe destacar su utilidad en dispositivos de emisión de campo (Hong *et al*, 2009; Ko *et al*, 2009) y como aditivos en composites cerámicos o poliméricos (Bokobza, 2007).

Aplicaciones biológicas

Las propiedades físicas, eléctricas, mecánicas y de superficie de los nanotubos de carbono han hecho despertar gran interés para su utilización en el campo de la biomedicina. A continuación se mencionan algunas de las aplicaciones donde los biomateriales están teniendo resultados prometedores en dicha área.

Estos nanomateriales pueden ser utilizados como portadores de fármacos, ya que son capaces de interactuar con él sin que sufra ninguna alteración y dirigirlo a las células diana (Riggio *et al*, 2009; Zhang *et al*, 2011; Madani *et al*, 2011). Además, por el hecho de estar formados por carbono, componente del cuerpo humano, cabe esperar que sean razonablemente biocompatibles. Esto supondría una gran ventaja con respecto a los métodos de suministro actuales, ya que así se conseguiría gran efectividad en la entrega del fármaco, evitando ciertos efectos acumulativos o dañinos. Además, la naturaleza de los nanotubos de carbono y su capacidad inusual de entrada rápida en las células presentadoras de antígenos, como las células dendríticas, los hacen especialmente útiles como portadores de antígenos, pudiendo comportarse como vacunas (Scheinberg *et al*, 2013; Gottardi & Douradinha, 2013). No sólo eso, sino que la mera entrada de los nanotubos de carbono en una célula específica, cancerígena principalmente, y su interacción con los múltiples componentes que allí existen, ejerza un efecto citotóxico para dicha célula. Esta última aplicación es el objeto de estudio de esta tesis doctoral.

Sorprendentemente, estos materiales, también pueden jugar un papel muy importante en el desarrollo de nuevos tejidos u órganos. Se ha visto como los nanotubos de carbono consiguen imitar el rol del colágeno como soporte en los tejidos óseos, sustituyendo a los materiales que se utilizan hoy en día como prótesis y aumentando así la resistencia, flexibilidad y biocompatibilidad (Zhao *et al*, 2005). También se está llevando a cabo estudios de nanotubos de carbono en prótesis visuales (Shoval *et al*, 2009) así como en músculos artificiales. Por último, en el campo de la cirugía, se barajan como sensores para el desarrollo de material quirúrgico inteligente, aplicable al ya existente.



II. OBJETIVOS

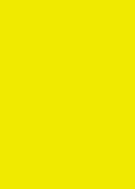
Objetivos



LOS OBJETIVOS CONCRETOS DE ESTA TESIS DOCTORAL SON LOS SIGUIENTES:

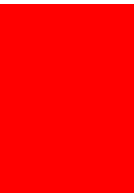
1. Optimización de la dispersión de los MWCNTs mediante funcionalización con proteínas séricas humanas.
2. Estudio del modelo teórico de interacción de los MWCNTs con los microtúbulos.
3. Estudio de los efectos anti-proliferativos, pro-apoptóticos y anti-migratorios de los MWCNTs en células cancerígenas humanas *in vitro*.
4. Desarrollo de un modelo de órgano tumoral, fácilmente identificable, cuantificable y reproducible para el estudio de los efectos antineoplásicos de los MWCNTs *in vivo* en tumores sólidos.
5. Investigación de los efectos antitumorales de los MWCNTs *in vivo* en modelos animales.
6. Estudio de los posibles efectos sinérgicos antitumorales de los MWCNTs con el taxol® en modelos animales.

Objetivos





III. MATERIALES Y MÉTODOS



3.1 CULTIVOS CELULARES

3.1.1 Líneas celulares y condiciones de cultivo

Todos los cultivos celulares (tabla 1), se mantuvieron en una incubadora a una temperatura de 37 °C, con unos niveles de CO₂ del 5% y una humedad relativa del 95%. La manipulación de las líneas celulares se realizó en condiciones estériles en una campana de flujo laminar.

Línea Celular	Origen	Medio de cultivo	Identificación celular de ATCC
HeLa	Células de cáncer de cuello de útero humano	DMEM 10%	ATCC® CCL2™
MCF 7	Células de cáncer de mama humanas	DMEM 10%	ATCC® HTB-22™
SH-SY5Y	Células de neuroblastoma metastásico humano	DMEM 10%	ATCC® CRL-2266™
U87MG	Células de glioblastoma multiforme humano	DMEM 10%	ATCC® HTB-14™
B16F10	Células de melanoma maligno de piel de ratón	IMDM 10%	ATCC® CRL-6475™
GBM	Células de explante de glioblastoma multiforme humano	DMEM 10%	Cultivo primario (ver datos abajo)

Tabla 1. Líneas celulares

Las líneas celulares se cultivaron en: medio de cultivo Medio Esencial Mínimo (MEM, Life Technologies, ref. 41090-028) o Medio de cultivo Iscoves de Dulbecco Modificado (IMDM, Life Technologies, ref. 21980-032) (Ver tabla 1). Suplementados con 10% de suero fetal bovino (FBS, Life Technologies, ref. 10270-106) inactivado (con calor a 50 °C durante 30 minutos) y filtrado. Antibiótico gentamicina 10 µg/mL (LONZA, ref. BE02-012E).

Las células de glioblastoma multiforme (GBM) son cultivos celulares de explantes de tejidos procedentes de especímenes quirúrgicos de pacientes del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. El crecimiento y cultivo de estas células (Ruiz-Ontañón *et al*, 2013) tuvo lugar en el laboratorio del Dr. José Luis Fernández-Luna, (IDIVAL).

3.1.2 Transferencia genética

La transferencia genética es una técnica empleada para introducir material genético en el interior de las células eucariotas. Existen diversos mecanismos para introducir este material genético, concretamente en esta tesis se ha utilizado la lipofección, que consiste en el uso de liposomas, que son complejos producidos mediante la mezcla de lípidos catiónicos con el material genético. Estos liposomas tienen afinidad por la membrana y permite la entrada del material genético en el citosol. El vector de expresión GFP:EB1 en eucariotas que contenía el cDNA del gen correspondiente se transfectó en células HeLa mediante la utilización de Lipofectamina 2000 (Invitrogen, ref. 11668019) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este vector fue proporcionado amablemente por la Dra. Akhmanova de la Universidad de Utrecht, Holanda (Honnappa *et al*, 2009).

3.1.3 Viabilidad celular

Para el análisis de viabilidad celular se utilizó el azul de tripán (del inglés *Tripan Blue*, Sigma-Aldrich, ref. T8154). Este compuesto sólo tiñe de azul las células muertas debido a que la membrana está permeabilizada, mientras que, en las células viables con la membrana intacta no puede penetrar. Para su evaluación las células fueron teñidas con azul de tripán diluido en medio de cultivo, luego se contaron en una cámara de Neubauer bajo el microscopio óptico (Nikon). También se utilizó bromuro de etidio (Sigma-Aldrich, ref. 46067) que tiene una actuación similar. Las células no viables permiten el paso del bromuro de etidio a través de su membrana, quedando éste intercalado en el ADN y el ARN, de manera que el núcleo y el citoplasma queda marcado en rojo.

3.1.4 Selección de linajes celulares resistentes a Taxol®

Las células B16F10 fueron expuestas a taxol® (Sigma-Aldrich, ref. T7191) 40 μ M durante 6 días. Pasado este tiempo se cambió el medio y se dejaron crecer las colonias resistentes durante 4 semanas.

3.2 MICROSCOPIA DE CONTRASTE DE FASES

El microscopio de contraste de fases acoplado a una cámara permite obtener imágenes de células vivas y sin ninguna preparación. Permite observar células vivas sin necesidad de añadir ningún tipo de tinción o colorante.

3.2.1 Convencional

Para las fotos de rutina el microscopio utilizado fue un Nikon eclipse ts100f invertido con una cámara digital Progress CT5 (Jenoptik).

3.2.2 Célula viva

Se llevó a cabo con un microscopio invertido Nikon Eclipse Ti *live-cell station*, usando un 10x Nikon NA 0.45. Este microscopio permite realizar fotografías a determinados intervalos de tiempo para después juntarlas, asignarles una velocidad y componerlas en forma de película, lo que recibe el nombre de video-microscopía de *Time-Lapse*. Las células fueron cultivadas en placas de cultivo de 6 pocillos donde fueron tratadas con 25 o 50 μ g/mL de MWCNTs. La adquisición de imágenes de células *in vivo* se realizó 48 horas después de este tratamiento y en la misma placa de cultivo. La temperatura de las células se mantuvo a 37 °C y 5% CO₂.

Las imágenes se tomaron cada 15 minutos durante 8 horas para posteriormente ser procesadas. Se analizaron más de 100 células en al menos tres experimentos para cada condición y tipo celular, y siempre teniendo en cuenta los respectivos controles.

3.2.2.1 Estudio de la división celular

La determinación de la proliferación celular se llevó a cabo cuantificando el tiempo de duración de las mitosis tanto en células tratadas con MWCNTs como en las células sin tratar (control). Se contabilizó el tiempo existente entre la imagen en la que la célula comienza la división (profase) y la imagen en la que la célula ya ha terminado el ciclo y ha dado lugar a dos células hijas independientes (figura 19).

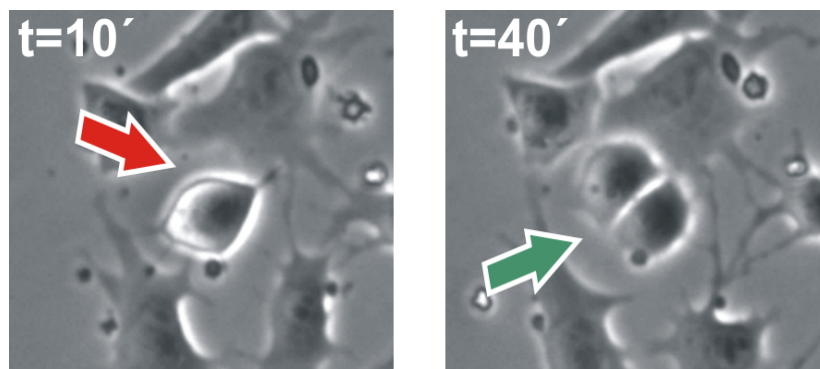


Figura 19. Estudio de la división celular. A la izquierda se representan la foto dónde la célula comienza la división (profase) y a la derecha la foto donde esa misma célula ya ha finalizado su ciclo celular. En este ejemplo la división ha comenzado a los 10 minutos de grabación y ha terminado a los 40, por lo que el tiempo total de división de esta célula se calcula en aproximadamente unos 30 minutos.

3.2.2.2 Estudio de la migración celular

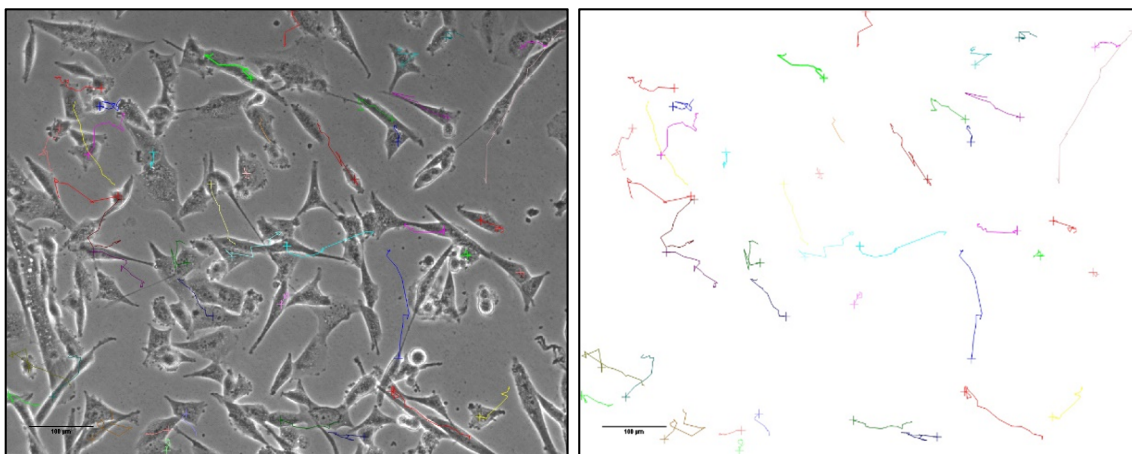


Figura 20. Estudio de la migración celular con el programa NIS-Elements. A la izquierda se representan todas las células estudiadas con sus correspondientes trayectorias a lo largo del tiempo de grabación. A la derecha se pueden ver sólo las trayectorias.

Para la determinación de las trayectorias celulares, se siguió y cuantificó la posición del núcleo de las células en imágenes de contraste de fase. El seguimiento de las células se realizó con el software NIS-Elements, que proporciona mediciones espacio-temporales detalladas, incluyendo velocidad media, distancia recorrida y trayectoria de la migración de cada una de las células marcadas (figura 20).

3.3 MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCENCIA

3.3.1 Inmunofluorescencia

Las células se crecieron sobre cubreobjetos de borosilicato redondos (Thermo, ref. 0385) y se fijaron utilizando distintos protocolos en función de los requerimientos experimentales. Se emplearon 3 tipos de fijaciones:

- Paraformaldehído (Electrón Microscopy Sciences, ref. 15710) al 4% en PBS (tampón fosfato salino, Lonza, ref. 17-516F).

- Glutaraldehído: Cl_2Mg 1M, TritónX-100 al 10%, glutaraldehído (Sigma-Aldrich, ref. G5882) y PBS. Tras la fijación con glutaraldehído es necesario eliminar la autofluorescencia generada. Para ello se añade NaBH_4 (2mg/mL) en PBS, repitiendo este proceso dos veces durante 10 minutos cada una.

- Metanol: Las células se incubaron durante 5 minutos en metanol puro (VWR, ref. 20903.368) a -20°C .

Tras la fijación, las células fueron permeabilizadas con Tritón X-100 al 0,1% en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se incubaron con los anticuerpos apropiados según el experimento determinado. Para almacenar los cubres fijados se dejan en una solución de PBS + 0,1% azida sódica a 4°C .

El anticuerpo primario comercial utilizado fue el anti α -tubulina B512 monoclonal de ratón, (Sigma-Aldrich, ref. T5168). Los anticuerpos secundarios utilizados fueron cabra anti IgG de conejo conjugado con Alexa 488, Alexa 647, Cy3 o Cy5 (Molecular Probes, refs. A11029, A21245, A10521 y A10524). Las combinaciones de anticuerpos secundarios fueron decididas para evitar posibles reacciones cruzadas. Para visualizar los núcleos se utilizó Hoechst 33258 o DAPI (Sigma-Aldrich, ref. B1155 y D8417). Las muestras se montaron en medio Immu-Mount (Thermo, ref. 9990402) sobre portamuestras (CellPath, ref. MAE-1000-03P).

3.3.2 Microscopía de epifluorescencia convencional

Para la microscopía de epifluorescencia de rutina se usó un microrcopio Zeiss Axiovert 200 M.

3.3.3 Microscopía de epifluorescencia en célula viva

Se llevó a cabo con un microscopio de epifluorescencia para videomicroscopía NIKON Ti equipado con una amplia combinación de sets de filtros, incubador de metacrilato y con sistemas automáticos de mantenimiento de foco, usando los objetivos de 20x y 100x Nikon NA 0.45

3.3.3.1 Determinación de la disposición de eje N-centrosomal durante la migración celular

EB1 (del inglés, *end binding protein-1*) es una proteína que se une de forma específica al extremo dinámico del microtúbulo. A esta proteína se le puede unir una proteína fluorescente (GFP, del inglés, *green fluorescent protein*) para que al transfectarlas en la célula (GFP:EB1) podamos observar en color verde la posición y trayectoria del centrosoma en la migración. El día previo al comienzo del experimento las células se transfectaron con GFP:EB1. Luego se trataron con MWCNTs y 48 horas después se llevaron al microscopio de célula viva, donde tras añadir un marcador nuclear (Hoechst), se grabaron distintas películas para estudiar tanto las trayectorias de la célula (núcleo) como del centrosoma, mediante el uso de fluorescencia.

3.4 MICROSCOPIA LÁSER-CONFOCAL

La microscopía láser confocal es una forma de tomografía óptica de fluorescencia. El microscopio confocal logra imágenes de secciones ópticas extremadamente finas, eliminando la interferencia que produce la luz que llega de los otros campos focales de todo el grosor de la muestra que se observa, consiguiendo así que el enfoque se realice sobre un único plano (confocal). Varios de estos planos focales obtenidos a lo largo del eje z se pueden juntar para hacer una reconstrucción tridimensional de la muestra.

El microscopio utilizado fue un Nikon A1R equipado con varias líneas de láseres: 405, 488, 514, 561, 633, además de dos sistemas de detección: por filtros en 4 canales y espectral de 32 canales con 3 rejillas de difracción diferentes.

3.5 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

Para las muestras biológicas el microscopio electrónico utilizado fue un JEM 1011 (JEOL) equipado con una cámara digital Gatan de alta resolución que se encuentra en los servicios tecnológicos del Instituto de Investigación Marqués de Valdecilla (IDIVAL). Las células o tejidos a analizar se lavaron dos veces con PBS, y se fijaron durante 1 hora con glutaraldehído al 3% en tampón fosfato 0,12M (pH 7,4). La post-fijación se realizó durante 1,5 h en tetróxido de osmio al 2% a temperatura ambiente. Después de varias etapas de lavado con tampón fosfato 0,1 M, la muestra se deshidrató en una serie gradual de acetona:

Acetona 30%, 15 minutos

Acetona 50%, 15 minutos

Acetona 70% + acetato de uranilo 1%, 30 minutos

Acetona 80%, 30 minutos

Acetona 90%, 30 minutos

Acetona anhidra, 30 minutos (dos pasos)

Propilenóxido, 30 minutos (dos pasos)

Posteriormente la muestra se integró en una resina tipo Durcupan (Fluka, Sigma-Aldrich, ref. 44611) y la polimerización se llevó a cabo en una estufa a 60 °C durante 48 h. Finalmente, los bloques se cortaron con un ultramicrotomo (Leica, Ultracut UCT). Se realizaron cortes semifinos de 1 µm de espesor que se tiñeron con azul de toluidina al 1% para valorar la correcta preservación del material. Los cortes ultrafinos de 60 nm se montaron en rejillas de níquel y se tiñeron con acetato de uranilo antes de su visualización, todo este procesamiento para TEM se llevó a cabo en colaboración los Drs. Juan Carlos Villegas e Íñigo Casafont, especialistas en microscopía electrónica y miembros del grupo de Nanomedicina.

3.6 CITOMETRÍA DE FLUJO

La citometría de flujo se basa en la utilización de luz láser para el recuento y clasificación de células según sus características morfológicas o presencia de biomarcadores fluorescentes. El análisis de la fluorescencia permite estudiar de forma cuantitativa y cualitativa del contenido total de ADN por célula, en aproximadamente 10.000 células por condición. Esto permite la determinación simultánea de los porcentajes de células en cada fase del ciclo celular, así como del porcentaje de células en la fracción G0 que representarían células en interfase. Para su estudio primero se contaron las células con el fin de obtener el mismo número en todas las muestras (aproximadamente 1×10^6 células/mL). El pellet celular resultante se fijó con paraformaldehído 4%, después se mezcló con PBS + Hoechst (bisbencimida) 1:100 y se incubó 12-14 horas a 4°C. Finalmente, se conserva en PBS a 4°C hasta el momento de su análisis, realizado con un citómetro de flujo FACSCanto™ (Becton-Dickinson, USA).

3.7 MODELOS ANIMALES Y MANIPULACIONES EXPERIMENTALES

3.7.1 Modelos animales

Embriones de pollo

En esta tesis doctoral se han empleado embriones procedentes de huevos fecundados de gallina. Los embriones de pollo fueron cultivados *ex-ovo* para disponer de fácil acceso (Dohle *et al*, 2009). Antes de introducir los huevos en la incubadora se limpiaron cuidadosamente, después fueron incubados en una estufa en calor húmedo a 37,5 °C. Se incubaron durante tres días en posición horizontal en una incubadora con movimiento de rotación continuo y humedad. Después se desinfectaron con etanol y todo el contenido del huevo se transfirió cuidadosamente a una placa de Petri,

se llevan a la incubadora, esta vez sin movimiento, y se incubaron a 37 °C y 60% de humedad (figura 21).

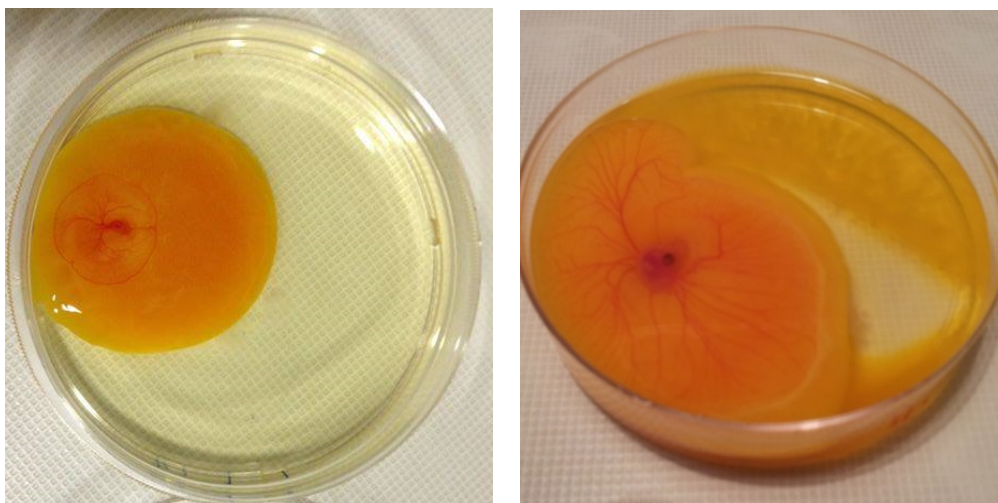


Figura 21. Cultivo *ex-ovo* de embriones de pollo.

Ratones

También se han llevado a cabo experimentos con ratones de experimentación. La experimentación animal se realizó en ratones neonatos albinos CD-1, los cuales se mantuvieron en el Servicio de Estabulación y Experimentación Animal (SEEA) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cantabria. El cuidado y manipulación de los animales se llevó a cabo siguiendo las normas de experimentación con animales dictadas por la directiva de la Comunidad Europea (86/609/CEE), de acuerdo con la legislación española vigente (Real Decreto 1201/ 2005) y siguiendo procedimientos aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Cantabria.

3.7.2 Generación de tumores

3.7.2.1 Xenotrasplantes en embrión de pollo *ex-ovo*

Tras 5 días *ex-ovo* en la placa de petri, se inyectan 2×10^5 células de melanoma murino (B16F10) con 20 μ L de IMDM + Agar 3,75% + rojo Ponceau, en las intersecciones de los vasos sanguíneos. Cuando los tumores eran visibles se procedía a su tratamiento con MWCNTs.

3.7.2.2 Alotrasplante en ratones

Todos los enfoques experimentales se utilizaron en camadas de ratones CD-1 postnatales de día o según se indique en cada capítulo. Cada camada era utilizada tanto para los ratones objeto de estudio como para sus controles, siendo por lo tanto un experimento en sí misma.

3.7.3 Procesamiento y estudio histológico de los tumores

En todos los casos los tumores fueron cuidadosamente disecados, pesados y fijados en formol al 4%. Pasadas 48 horas algunas de las muestras fueron deshidratadas en alcohol y xilol a concentraciones crecientes desde el 70% hasta el 100% e incluidas en parafina. Secciones de 5 μm de grosor fueron teñidas con hematoxilina-eosina usando métodos convencionales y se valoraron con un microscopio óptico (Nikon, Eclipse ts100f). Este estudio histopatológico fue llevado a cabo por el Dr. Fidel Fernández, anatómo-patólogo del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla y miembro del grupo de Nanomedicina.

3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para todos los estudios estadísticos se utilizó la t de Student. Las diferencias fueron consideradas no significativas cuando $p \geq 0,05$ (ns), significativas cuando $p < 0,05$ (*), muy significativas si $p < 0,01$ (**) y altamente significativas cuando $p < 0,001$ (***). Estos análisis se llevaron a cabo empleando el programa informático SigmaPlot 8.0.

3.9 NANOTUBOS DE CARBONO

3.9.1 Procedencia

Los MWCNTs utilizados en esta tesis doctoral fueron sintetizados en el laboratorio del Dr. Emmanuel Flahaut, del Centro Interuniversitario de Investigación e Ingeniería de Materiales (CIRIMAT) de la Universidad de Toulouse, siguiendo el método de deposición química de vapor (Flahaut *et al*, 2005a).

3.9.2 Dispersión y funcionalización

Para los estudios de rutina de los MWCNTs se resuspendieron en medio de cultivo con 30% de suero fetal bovino mediante ciclos repetidos de vortex seguidos de leve sonicación (3 minutos, frecuencia de 20 kHz, 130 W) en un sonicador SONICS Vibra-cell VCX130 (Fanarraga *et al.*, 2014). Para comprobar la estabilidad de la suspensión de esta solución se centrifuga a 14000 g después de cada ciclo de sonicación. Entre 3 y 5 ciclos fueron suficientes para obtener una solución stock de MWCNTs resuspendidos. La concentración de MWCNTs se estimó en una recta patrón obtenida al medir directamente la absorbancia de una muestra stock (con una concentración conocida de MWCNTs) a 550 nm en un colorímetro Biochrom Libra S2.

3.9.3 Análisis de la pureza y características estructurales

Las pautas para sintetizar los MWCNT no garantizan al 100% la homogeneidad del producto en relación a su longitud y diámetro, y además pueden existir diferentes impurezas debido a subproductos no deseados tras el tratamiento químico. Debido a todo ello, y teniendo en cuenta que la toxicidad de los nanotubos de carbono depende en gran medida de sus propiedades, resulta muy importante conocer las características de estos nanomateriales. Es evidente que el tamaño tan pequeño de estos materiales conlleva el uso de diferentes y sofisticadas técnicas para su caracterización, en este caso el estudio lo llevamos cabo mediante: espectroscopia Raman, microscopía electrónica de transmisión (TEM) y análisis termogravimétrico (TGA).

Espectroscopía Raman

La Espectroscopia Raman es una técnica fotónica de alta resolución que proporciona información química y estructural de casi cualquier material o compuesto permitiendo así su identificación. Se basa en incidir un haz de luz monocromático sobre una muestra y examinar la luz dispersada. Se empleó un sistema de espectrómetro Raman T64000 (Horiba), junto con un láser Kriptón-Argón (se utilizó la línea verde 514,5 nm) y una CCD refrigerada con nitrógeno (Jobin-Yvon Symphony) acoplada a un microscopio confocal para la detección. El software LabSpec permite la adquisición y el tratamiento de los datos. Las mediciones

espectroscópicas, así como el manejo y evaluación de los resultados fueron llevados a cabo por el Dr. Jesús González, investigador MALTA (Materia a alta presión), del Departamento de Física Aplicada y miembro del grupo de Nanomedicina.

Los MWCNTs utilizados producen un espectro Raman característico, perfectamente distinguible donde se observa una intensa banda en 1330 cm^{-1} denominada banda D (del inglés "*Disorder induced*"), la banda tangencial G en 1586 cm^{-1} , y la banda D' en 1614 cm^{-1} (figura 22).

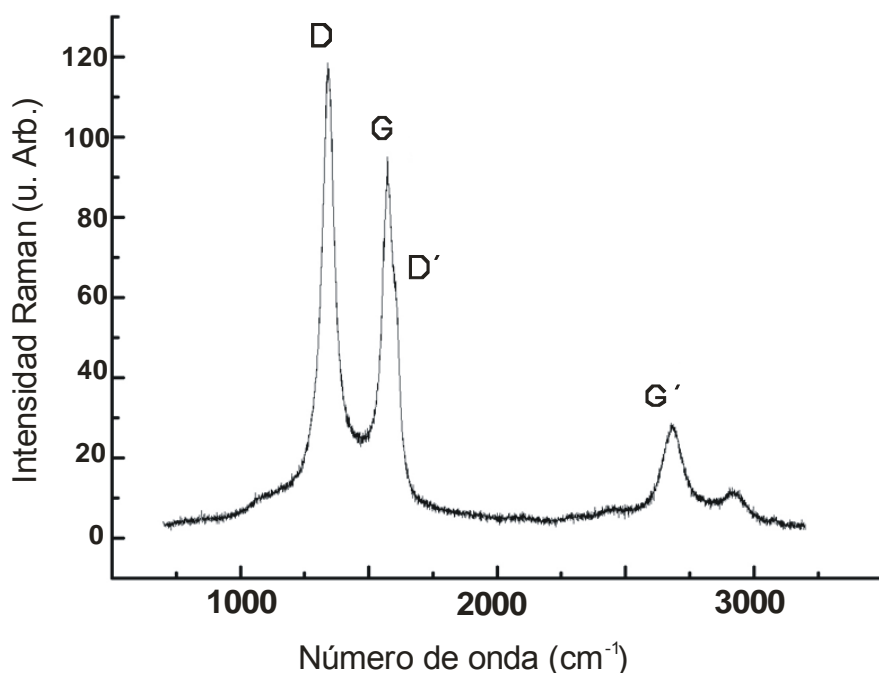


Figura 22. Espectro Raman de los MWCNTs.

Microscopía electrónica de transmisión

El microscopio electrónico de transmisión utilizado fue un Jeol JEM 2100 con una cámara Gatan Orius SC 1000B. Los estudios fueron llevados a cabo por la doctora Lidia Rodríguez, técnico responsable del Servicio de Microscopía Electrónica de Transmisión (SERMET) de la Universidad de Cantabria.

En las imágenes obtenidas mediante TEM se puede observar un racimo de MWCNTs formados por un número de paredes variable, de entre 3 a 12, con el diámetro exterior de entre 5-20 nm y el diámetro interno entre 2,5 y 10 nm, y con aproximadamente de entre 1,2 a 1,3 μm de longitud (figura 23).

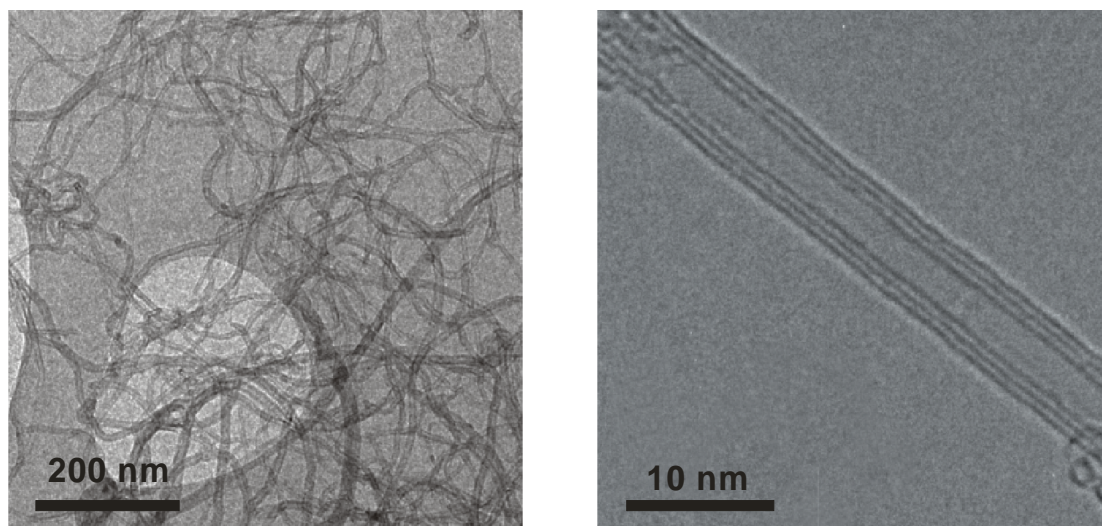


Figura 23. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de los MWCNTs. Imagen TEM de un grupo de nanotubos a la izquierda y a la derecha detalle de un MWCNT de 3 paredes, con un diámetro exterior de aproximadamente unos 5 nm e interior de aproximadamente 2,5 nm.

Análisis termogravimétrico

La termogravimetría se basa en la medida de la variación de la masa de una muestra cuando es sometida a un programa de temperatura en una atmósfera controlada. La variación de masa puede ser una pérdida o una ganancia de masa. El análisis termogravimétrico (TGA) se realizó en un equipo TG-DSC marca SETARAM Modelo Setsys Evolution 1750, cuyo rango de temperatura abarca desde la temperatura ambiente hasta los 1500 °C. Se colocó la muestra en una micro balanza, la cual está introducida en un horno de alta precisión. Las mediciones se llevaron a cabo por calentamiento, aproximadamente 10 mg de MWCNTs en nitrógeno seco y en aire seco: de 35 °C hasta 1000 °C a una velocidad de 10 °C min⁻¹ y flujo de gas de 20 cm³/min.

El TGA mostró una curva característica típica de los nanotubos de carbono, donde la oxidación del anillo hexagonal de carbono apareció a 550 °C. La información cualitativa sobre la pureza de los nanotubos se pudo obtener a partir del grado de residuo no oxidable a alta temperatura, que como se puede apreciar en la gráfica es nulo. La pérdida de peso a temperaturas inferiores a 500 °C se asocia con el desprendimiento y la fragmentación de restos grupos terminales oxigenados (figura 24).

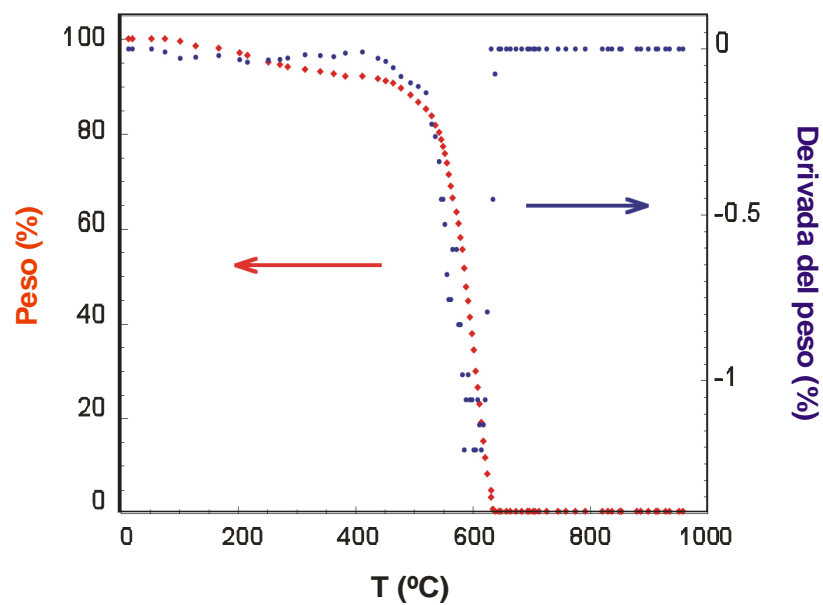


Figura 24. Análisis termogravimétrico (TGA) de los MWCNTs. Curva termogravimétrica típica de los MWCNTs donde la velocidad de degradación máxima se observa a 550 °C.



IV. RESULTADOS



4.1 PLANTEAMIENTO DE TRABAJO

Existen medicamentos contra el cáncer tradicionales que se han utilizado desde hace más de 50 años. Como ya he descrito en la introducción, dichos fármacos, entre otros, son una serie de compuestos que interfieren en la dinámica de los microtúbulos, comportándose bien como agentes desestabilizadores o estabilizadores de microtúbulos (Matson & Stukenberg, 2011; Jordan & Wilson, 2004; Zhou & Giannakakou, 2005; Jordan, 2002). Ambos tipos de fármacos inhiben la formación de la placa metafásica y el ensamblaje del huso mitótico, bloqueando a las células en este punto (Matson & Stukenberg, 2011) y desencadenando la muerte celular por apoptosis (Jordan & Wilson, 2004).

Sin embargo, las células cancerosas han encontrado varias formas para evitar los efectos de estos fármacos, bien sea mediante mutaciones en el sitio de unión del fármaco a la molécula de tubulina; modificaciones post-traduccionales de la tubulina a la que se unen; cambios en las proteínas de regulación de la tubulina; o incluso cambios en la composición de la tubulina que forma los microtúbulos. Además, las células cancerosas típicamente modulan las vías de señalización y dan lugar a una salida rápida de mitosis por un mecanismo llamado deslizamiento mitótico, evitando de este modo el efecto apoptótico provocado por los fármacos (Orr *et al*, 2003). Como resultado de la inestabilidad genómica inherente al cáncer se impulsa la evolución del tumor hacia la resistencia (de forma Darwiniana).

Propiedades biomiméticas de los MWCNTs con los microtúbulos

Estudios realizados en nuestro laboratorio con anterioridad demostraban como los MWCNTs interactúan con los microtúbulos (Rodríguez-Fernández *et al*, 2012) lo que nos llevó a diseñar un modelo de interacción biomimética entre los MWCNTs con estos polímeros biológicos (figura 25). El modelo de interacción se basa en las características que comparten los MWCNTs y los microtúbulos. Ambos tienen dimensiones y propiedades de superficie similares, son cilindros huecos constituidos por subunidades que se auto-ensamblan y forman racimos (Pampaloni & Florin, 2008). También son altamente flexibles y muestran una significativa resiliencia. Pese a todas estas características comunes existe una gran diferencia entre ellos y es que mientras los microtúbulos son altamente dinámicos, como explico en la

introducción, se someten continuamente a ciclos de crecimiento y decrecimiento, (Cassimeris *et al*, 1988), los MWCNTs son completamente estáticos. Debido a ello la interferencia de los nanotubos con la dinámica de los microtúbulos resulta en un bloqueo de la división celular y la segregación cromosómica asimétrica que, finalmente, conduce a la muerte celular por apoptosis.

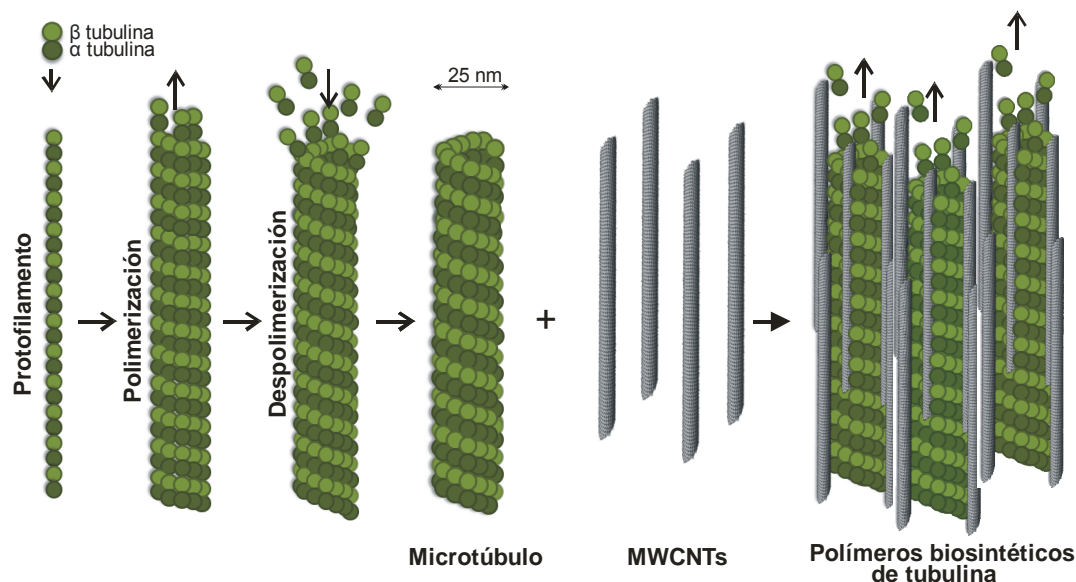


Figura 25. Modelo de interacción biomimética de los MWCNTs con los microtúbulos. Los microtúbulos son polímeros tubulares de 13 protofilamentos constituido por subunidades de $\alpha\beta$ -tubulina. Tienen un alto dinamismo tanto *in vitro* como *in vivo* por lo que, en presencia de MWCNTs, se forman polímeros biosintéticos que restringen su dinámica aumentando su estabilidad (García-Hevia, *et al*. 2015b).

Todos estos efectos son fenotípicamente idénticos a los que producen los fármacos que interfieren en la dinámica de los microtúbulos (descritos en la introducción). Sin embargo, la interacción de los MWCNTs con los microtúbulos es completamente diferente a la de cualquiera de los fármacos de unión a microtúbulos mencionados. Mientras los fármacos se unen a pequeñas zonas de contacto o bolsas dentro del polipéptido β -tubulina (descrito ampliamente en la introducción), los nanotubos de carbono interaccionan a lo largo de todo el lateral de los protofilamentos de tubulina (figura 26). Por lo que existe una gran superficie de interacción entre el nanotubo de carbono y el polímero de tubulina, que es mucho más estable que la producida por cualquiera de esos fármacos.

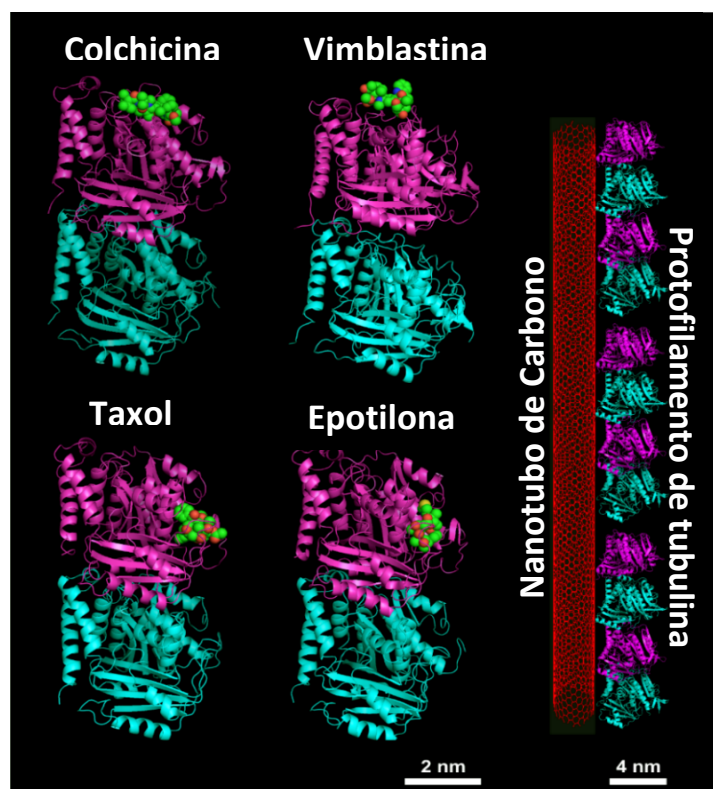


Figura 26. Comparación de la interacción de los fármacos tradicionales con la tubulina frente al modelo de interacción del nanotubo de carbono con el protofilamento de tubulina. Se muestra la estructura de la α -tubulina representada en azul, la de la β -tubulina en magenta y los sitios diana de las diferentes moléculas en verde. (Datos de identificación del NCBI cuyo número es: 3E22, 4I4T, 1JFF y 1TVK, respectivamente). Los fármacos destabilizadores de microtúbulos se muestran arriba y los fármacos estabilizadores de microtúbulos abajo. El modelo de interacción lateral entre el MWCNT (rojo) y un protofilamento tubulina se muestra a la derecha (García-Hevia *et al*, 2014).

Este modelo del mecanismo de interacción de los nanotubos de carbono con la tubulina presenta varias ventajas frente al de los fármacos tradicionales. Por una parte, el hecho de que la interacción tenga lugar a lo largo de todo el protofilamento, es decir, que exista un contacto intermolecular lateral, hace improbable la aparición de resistencias por diferentes mutaciones o cambios post-traduccionales en el polipéptido de tubulina. Además, la interacción del nanotubo de carbono sigue permitiendo la unión de los fármacos tradicionales a la molécula de β -tubulina, por lo que tendría un efecto sinérgico y complementario al de estos fármacos.

4.2 FUNCIONALIZACIÓN DE LOS MWCNTs

La funcionalización de los nanotubos de carbono es el recubrimiento con proteínas u otras moléculas o la modificación química de su superficie. La

funcionalización de los nanotubos de carbono es crucial para disminuir su toxicidad y ampliar el alcance de sus aplicaciones. Así, la funcionalización produce una serie de ventajas clave, como son: mejorar su dispersabilidad, aumentar su interacción con los receptores celulares y ayudar a su biocompatibilidad. El objetivo final que deseamos conseguir es implementar la entrada de los MWCNTs en las células y que así puedan ejercer su acción antineoplásica.

Ante lo anteriormente expuesto y dado que estos nanomateriales van a ser utilizados en soluciones biológicas (cultivos celulares, tumores...) tienen gran interés biomédico dispersarlos en componentes biológicos. Los MWCNTs empleados en estos experimentos fueron funcionalizados en sueros de diferentes especies, ya que este es un aditivo estándar en el medio de cultivo. El suero sanguíneo es el componente de la sangre resultante tras la coagulación de ésta y eliminación del coágulo que se forma. Es equivalente al plasma sanguíneo, pero sin las proteínas involucradas en la coagulación. Desarrollamos un protocolo que se encuentra completamente detallado en la patente que nuestro grupo ha publicado recientemente (Fanarraga *et al*, 2014), que en resumen consiste en ciclos de sonicación suaves en el medio correspondiente, seguidos de una completa centrifugación para eliminar posibles agregados. Los resultados que obtuvimos fueron una resuspensión parcial en suero de conejo y casi total en suero de caballo. A la vista de estos resultados, se comprobó también, que el suero fetal bovino, que se utiliza para maximizar el crecimiento de los cultivos celulares, era un buen medio para la correcta funcionalización y dispersión de los nanotubos de carbono.

En este contexto, nos pareció interesante conocer la cantidad de suero que se unía al nanotubo de carbono una vez que está completamente funcionalizado. Para ello, resuspendimos los MWCNTs en suero fetal bovino y tras numerosos lavados por centrifugación en agua destilada realizamos un análisis termogravimétrico. Los resultados muestran que el 33% de pérdida de peso es debido a la presencia del suero en los MWCNTs (figura 27). Este resultado es muy importante, ya que nos permite saber que para saturar completamente los sitios de unión de los MWCNTs con una mezcla compleja de proteínas es necesario aproximadamente un 33% de su peso en

proteínas. En este caso es con suero pero este dato es extrapolable a otras proteínas con las que en un futuro se pretenda trabajar.

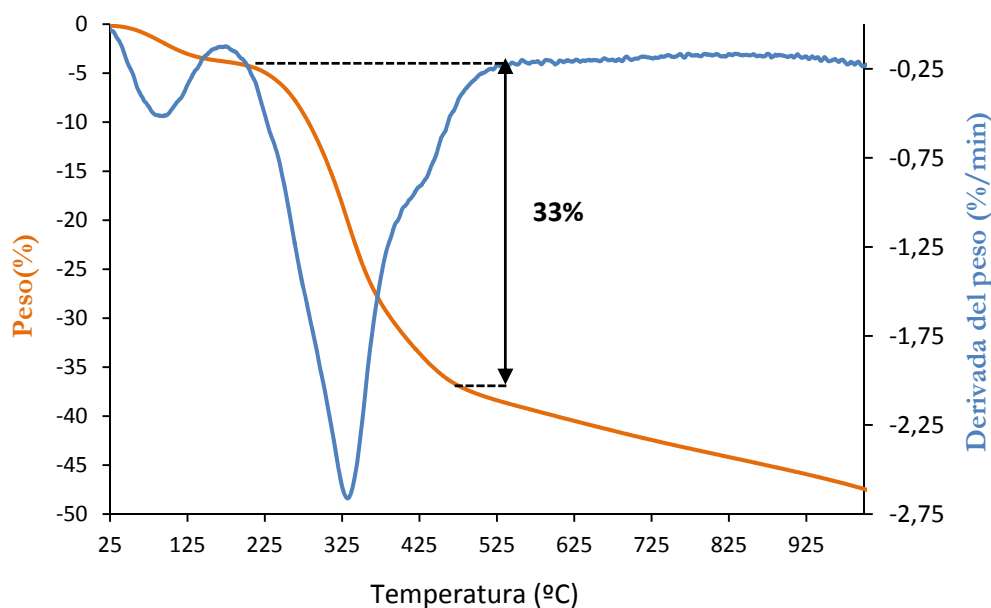


Figura 27. Análisis termogravimétrico de los MWCNTs resuspendidos en medio fetal bovino. Se aprecia claramente en la curva que aproximadamente el 33% de la pérdida de peso ocurre en temperaturas más bajas que cuando se analizan nanotubos, por lo que se debe a la presencia del suero.

Teniendo en cuenta que los estudios futuros se centrarán en el uso de MWCNTs como terapia antineoplásica alternativa en humanos, consideramos que la correcta funcionalización debería de ser (entre otros) con suero humano. De esta manera, se evitarían reacciones inmunológicas no deseadas y se obtiene una separación correcta de los nanotubos de carbono en suspensión para que puedan desempeñar su adecuada actividad antineoplásica. Así pues, en colaboración con el hematólogo Jorge Monge Ruiz, del Centro Vasco de Transfusión y Tejidos Humanos, obtuvimos sueros procedentes de la sangre de 6 pacientes: 3 hombres y 3 mujeres. Todos ellos con diferentes parámetros bioquímicos en sangre (tabla 2). Los parámetros que se estudian en una bioquímica de rutina en sangre son la concentración de varias sustancias químicas que se encuentran en la sangre en el momento del análisis (glucosa, triglicéridos, urea, proteínas, etc).

Suero	Glucosa mg/dL	Urea mg/dL	Creatinina mg/dL	Ac. Urico mg/dL	ALT/GPT U/L	Gamma-GT U/L	Fosfata Alcalina U/L	Bilirrubina Total mg/dL	Colesterol total mg/dL	Triglicérido mg/dL	Calcio total mg/dL	Sodio mEq/dL	Potasio mEq/dL	Proteínas tot. g/dL
3	83	43	1,25	5,4	21	45	99	0,45	208	145	10,04	146	3,94	7
4	124	25	0,91	5,5	29	49	71	0,17	179	135	8,96	146	4,1	6,9
5	101	51	1	5,3	18	33	74	0,31	155	78	9,59	149	4,24	6,6
6	116	18	0,81	3,5	17	6	58	0,24	209	116	9,17	148	4,07	6,6
7	106	44	1,01	5,3	24	10	70	0,33	250	67	9,63	143	4,82	7,1
6	106	56	0,71	3,9	20	20	129	0,32	188	128	9,58	147	3,59	7,6

Tabla 2. Análisis bioquímico de los pacientes cuyo suero hemos utilizado para el estudio.

Los MWCNTs se resuspendieron en medio de cultivo con 10% de estos sueros humanos y luego se siguió el protocolo de funcionalización desarrollado para esta técnica (ver materiales y métodos). Los resultados revelan que la concentración final de nanotubos de carbono resuspendida es diferente en cada caso, por lo que no todos los sueros humanos sirven para resuspender de igual manera estos nanomateriales (figura 28).

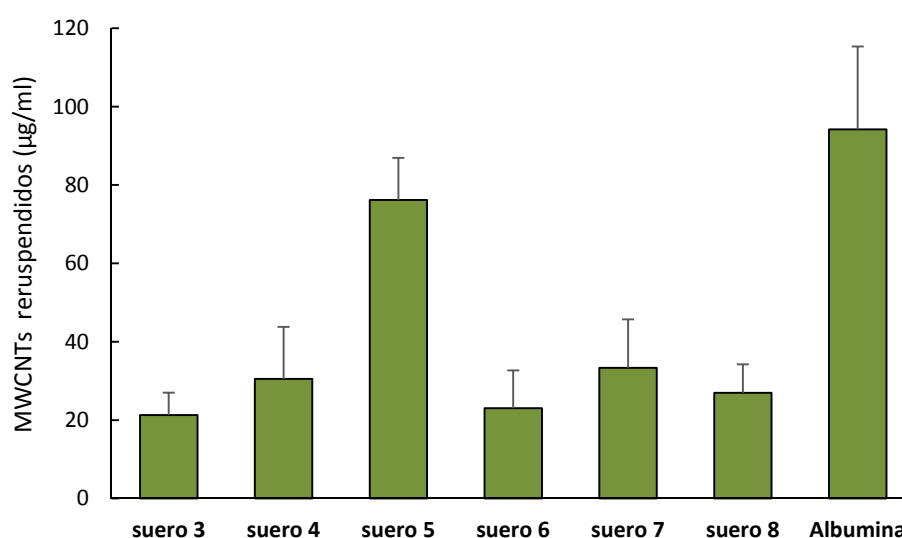


Figura 28. Resuspensión de MWCNTs en distintos sueros humanos. Gráfico de los valores de resuspensión de los MWCNTs en 6 tipos de sueros humanos y en albúmina humana. Se observa claramente que existe una amplia variedad en los resultados, destacando notablemente el suero 3 con la mayor capacidad para resuspender MWCNTs.

A la vista de los resultados tan variables en estos sueros, decidimos estudiar al detalle los distintos parámetros bioquímicos que hacen diferentes a estos sueros. Es entonces cuando observamos que existe relación entre la cantidad de triglicéridos presentes en el plasma (tabla 2, columna remarcada de verde) y el grado de resuspensión de los sueros. En concreto vemos que cuanto mayor es la concentración de triglicéridos en suero peor se resuspenden los nanotubos. Como consecuencia de esta variabilidad obtenida lo más lógico es resuspender los MWCNTs en albumina humana pura. Los resultados muestran una resuspensión muy óptima (figura 28).

Finalmente concluimos que a pesar de que sería interesante resuspender los nanotubos de carbono en el suero del propio paciente, los resultados muestran que no todos los sueros resuspenden los MWCNTs igual de bien y que parece que los lípidos podrían interferir de forma significativa. Por ello, la funcionalización de los nanotubos de carbono solamente con albúmina humana parece ser la mejor opción, ya que es la proteína sérica más abundante en el plasma sanguíneo y responsable del transporte de muchas moléculas por el sistema circulatorio.

4.3 LOS MWCNTs TIENEN EFECTO CITOTÓXICO EN CÉLULAS CANCERÍGENAS HUMANAS *IN VITRO*

En nuestro laboratorio se ha descrito el efecto de los MWCNTs en células HeLa. Se demostró cómo la presencia de estos filamentos en el interior de las células interaccionaban de forma biomimética con los microtúbulos, interfiriendo con su dinámica, ejerciendo una acción anti-proliferativa (Rodríguez-Fernández *et al*, 2012). Aunque este modelo celular se utiliza frecuentemente en investigación debido a que está bien caracterizado, esta línea celular no es representativa de los cánceres malignos, por lo que nos pareció interesante corroborar estos resultados en otros modelos de células de cáncer humanas. Por ello utilizamos dos líneas celulares neuronales derivadas de glioblastoma multiforme humano U87MG y células de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Estas células derivan de tumores de origen neuroepitelial procedentes de metástasis humanas. La línea celular SH-SY5Y procede de una metástasis de origen neural de una biopsia de médula ósea. La línea celular U87MG deriva de un tumor de glioblastoma grado IV. Los glioblastomas representan más del

40% de todos los tumores humanos intracraneales y uno de los más comunes, agresivos y malignos entre las neoplasias de la glía en adultos. Las células de glioblastoma U87MG son altamente heterogéneas y normalmente hipodiploides (aneuploidías donde las células llevan 45 cromosomas o menos). Para complementar el estudio utilizamos células procedentes de explantes de glioblastoma multiforme humano (GBM) obtenido a partir de pacientes de quimioterapia no tratados. Estas células las obtuvimos en colaboración con el Dr. José Luis Fernández Luna, director de la unidad genética del Hospital Valdecilla. Dichas células derivadas de muestras quirúrgicas, son un modelo interesante porque no son líneas celulares de cáncer estándar y por lo tanto representan una versión que se asemeja más a la heterogeneidad inherente al tumor. Teniendo en cuenta todo esto sería de esperar un creciente grado de malignidad en estas variedades celulares, siendo las células de neuroblastoma SH-SY5Y las más benignas de todas ellas. El modelo celular de U87MG o el explante derivado de cultivos de glioblastoma multiforme son genéticamente más heterogéneos y se espera que muestren mecanismos sofisticados de resistencia a los efectos citotóxicos de la quimioterapia.

Como estándar en primer lugar se decide cuantificar mediante citometría de flujo el grado de muerte celular provocada por los MWCNTs. Este estudio demuestra que las células expuestas a 25 $\mu\text{g/mL}$ MWCNTs en el medio de cultivo durante 70 horas muestran un aumento considerable de la apoptosis, que queda de manifiesto en imágenes del cultivo (figura 29). Estos datos además revelan un aumento de células en las fases del ciclo celular S-G2 que sugiere un bloqueo de la proliferación celular (como se explica en la introducción) desencadenando una mayor tasa de apoptosis (figura 29). Estas células presentan cambios morfológicos a modo de extensiones citoplasmáticas anormales previamente descritas (Rodríguez-Fernández *et al*, 2012). También se observó que el tratamiento con MWCNTs producía un amplio espectro de aberraciones mitóticas: husos con dos placas metafásicas, sin centrosoma, con un centrosoma o con varios, así como también divisiones celulares asimétricas que llevan a la parada de la mitosis y finalmente a la muerte por apoptosis (Rodríguez-Fernández *et al*, 2012).

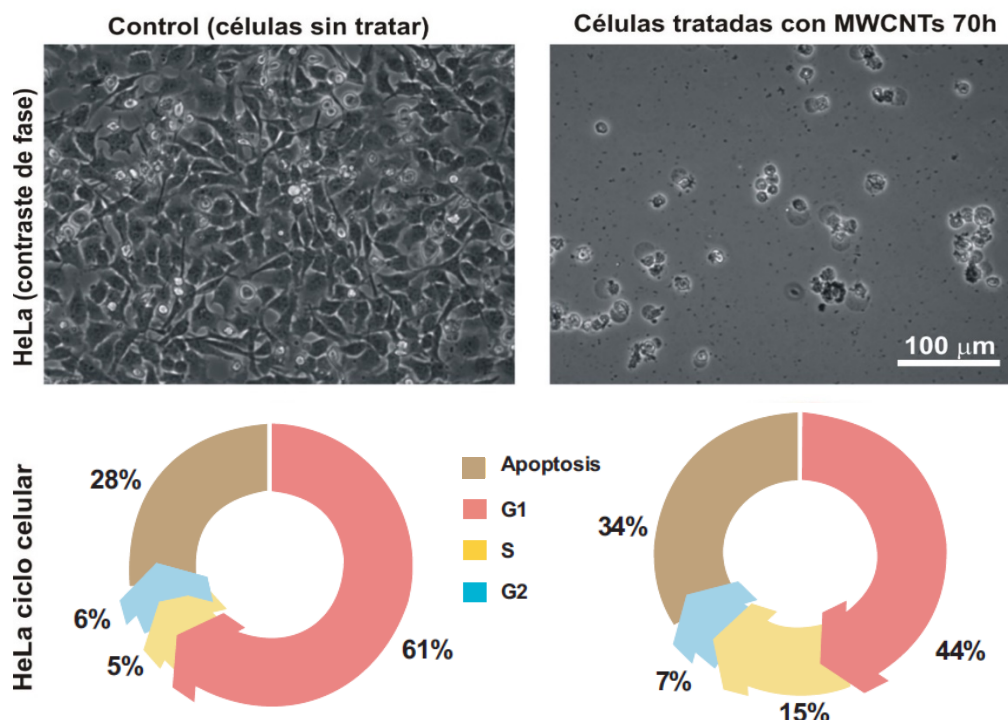


Figura 29. Efecto citotóxico de los MWCNTs en células HeLa. Arriba: imagen de contraste de fase de células HeLa control (sin MWCNTs) y células tratadas con MWCNTs (25 μ g/mL durante 70 h). Abajo: gráficos resumen de la citometría que muestran las proporciones de células HeLa en las diferentes etapas del ciclo celular, tanto en los controles como en las tratadas durante 70 h. Se observa que, tras el tratamiento con MWCNTs existe un descenso en el porcentaje de células en la fase G1 (células que no se dividen, representadas en color rosa), un aumento de las células en S-G2 (amarillo/azul) y una mayor tasa de apoptosis (aumento de un 6%, marrón). Los cambios en el ciclo celular son indicativos de un efecto anti-proliferativo de los MWCNTs en las células HeLa (García-Hevia *et al*, 2015a).

Como en el estudio anterior y tras obtener estos resultados en células HeLa decidimos realizar este estudio en células más realistas de cáncer humano. Así, incubamos estas células en presencia de 25 μ g/mL de MWCNTs durante 70 horas y analizamos los efectos apoptóticos por citometría de flujo. Bajo estas condiciones se produce un efecto citotóxico significativo en células de neuroblastoma SH-SY5Y (aumento de más de 40% en la apoptosis después de 70 h exposición), mientras que en la línea celular U87MG, producen un efecto casi insignificante. En las células derivadas del espécimen quirúrgico de glioblastoma multiforme, el tratamiento con MWCNTs produjo un aumento en la muerte celular de aproximadamente un 14% (figura 30, GBM).

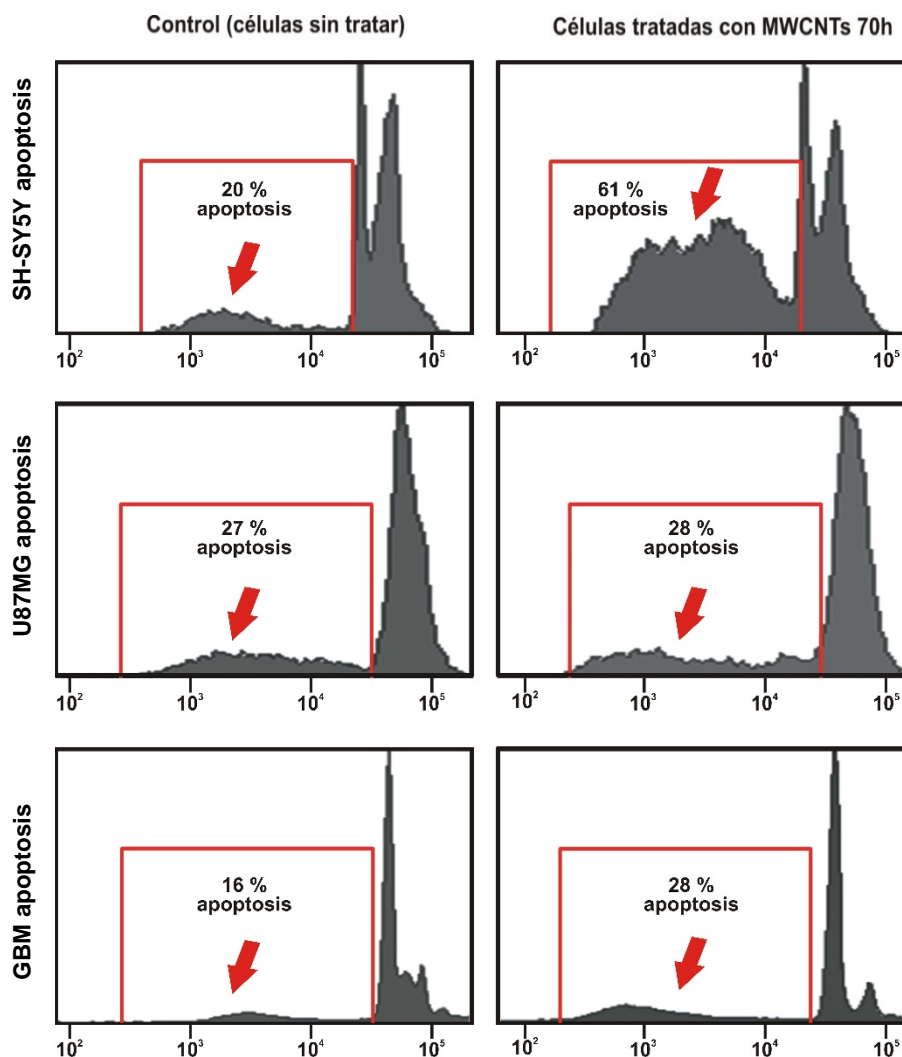


Figura 30. Efecto citotóxico de los MWCNTs en diferentes líneas celulares de cáncer humanas. Gráficos de citometría de flujo que muestra la fracción sub-G1 (cuadro rojo) de células de neuroblastoma SH-SY5Y, células de glioblastoma multiforme U87MG y células humanas procedentes de muestras quirúrgicas de glioblastoma multiforme (GBM), todos tratados con 25 $\mu\text{g/mL}$ de MWCNTs en el medio de cultivo durante 70 h.

También estudiamos el efecto citotóxico de los MWCNTs mediante microscopía de fluorescencia confocal en los distintos tipos celulares. En las inmunofluorescencias obtenidas se pueden apreciar células en metafase, cuerpos apoptóticos y particularmente fragmentación y compactación del ADN, rasgos típicos de la muerte celular programada. Como determinamos por citometría de flujo, las células de neuroblastoma SH-SY5Y control (no tratadas con MWCNTs) tienen una tasa de división alta que se muestra en gran número de células en metafase (figura 31, flechas blancas vacías). Sin embargo, en las imágenes de las células expuestas a

MWCNTs se aprecian muchas de ellas con ADN en manchas compactas, indicativo de la muerte celular por apoptosis después del tratamiento (figura 31, flechas blancas).

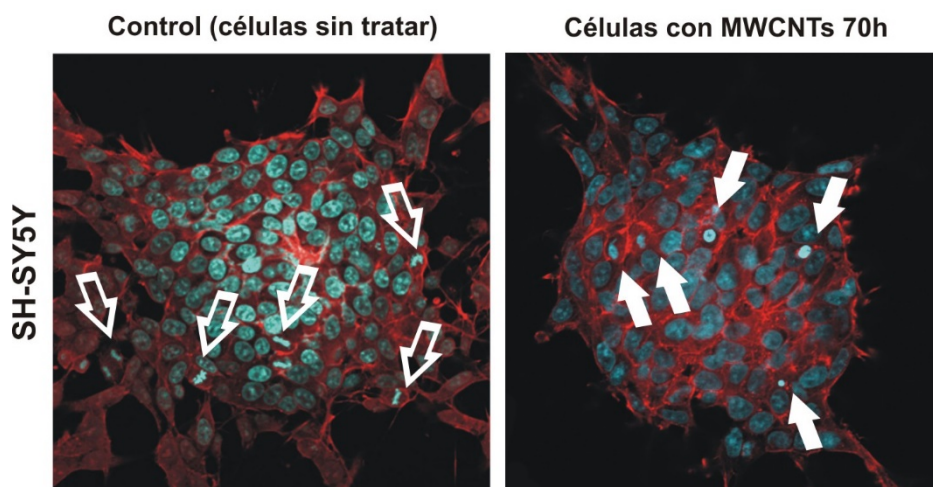


Figura 31. Identificación de apoptosis en células SH-SY5Y. Imágenes de microscopía confocal de células SH-SY5Y sin tratar (izquierda) y tratadas (derecha) con 25 µg/mL MWCNTs. Las células se tiñeron con Hoechst (canal azul) para marcar el ADN y con faloidina rodaminada (canal rojo) para la corteza celular. Se observan bastantes imágenes de cromosomas mitóticos (flechas blancas vacías) en las células no tratadas, mientras que los cuerpos apoptóticos resultantes de la fragmentación del ADN y la compactación (flechas blancas) se incrementan significativamente en las células tratadas con MWCNTs.

En el cultivo de células U87MG no tratadas también se observan varias mitosis. Además, existen patrones nucleares aberrantes y cuerpos apoptóticos ocasionales, lo que caracteriza a un alto grado de inestabilidad genómica, característica típica de las líneas celulares malignas. Sin embargo, en las células tratadas aumentaron tanto el número de cuerpos apoptóticos como la proporción de células multinucleadas, probablemente como consecuencia de la interferencia de los MWCNTs con la dinámica del huso mitótico durante la mitosis (figura 32) y la alta resistencia a la apoptosis desencadenada por aberraciones mitóticas, lo que conduce a la distribución aberrante de los cromosomas entre las células hijas.

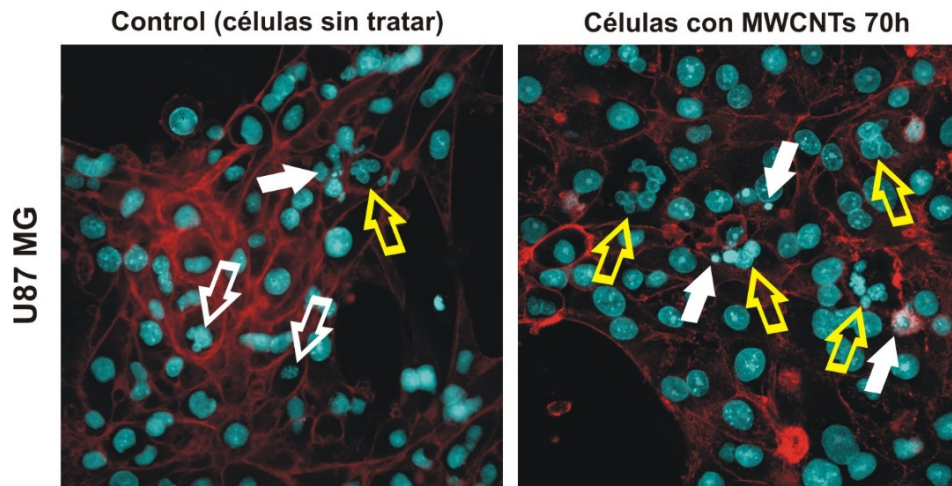


Figura 32. Identificación de apoptosis en células U87MG. Imágenes de microscopía confocal de células U87MG sin tratar (izquierda) y tratadas (derecha) con 25 µg/mL MWCNTs. Las flechas blancas vacías muestran la fragmentación y compactación del ADN mientras que las amarillas apuntan a células multinucleadas.

Por su parte, en las células derivadas de glioblastoma multiforme de cultivos primarios se observó que los tamaños de las colonias de células eran más pequeñas y existía una reducción significativa de las mitosis, lo que sugiere que la presencia de MWCNTs interfiere en la proliferación celular. Además, también se puede observar algún cuerpo apoptótico (figura 33).

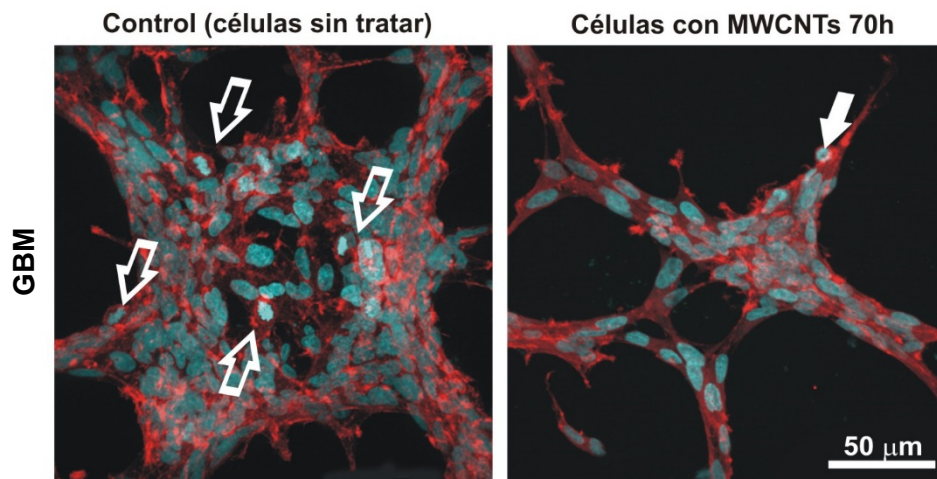


Figura 33. Identificación de apoptosis en células de glioblastoma multiforme. Imágenes de microscopía confocal de células de glioblastoma control y tratadas con 25 µg/mL MWCNTs. Las flechas blancas vacías muestran la fragmentación y compactación del ADN.

A la vista de los resultados obtenidos queda de manifiesto que los MWCNTs apenas tienen efecto apoptótico en las células U87MG, probablemente debido a que son células más malignas, capaces de desarrollar mecanismo de resistencia. En estos tipos de células sería necesario una mayor dosis de nanotubos de carbono o la utilización de terapias sinérgicas como por ejemplo el taxol® o cualquier fármaco que interfiera con la dinámica microtubular, para potenciar así su efecto y conseguir mejores resultados.

4.4 LOS MWCNTs TIENEN EFECTO ANTIMIGRATORIO EN CÉLULAS CANCERÍGENAS HUMANAS *IN VITRO*

Estudios anteriores en nuestro laboratorio demostraron que la estabilización de los microtúbulos de la célula mediante su interacción con nanotubos de carbono favorece la nucleación ectópica de los microtúbulos y la desorganización centrosomal (Rodríguez-Fernández *et al*, 2012). Sabiendo la importancia que ello tiene en la migración celular, nos planteamos comprobar hasta qué punto podría estar afectada la migración de estas células cuando están tratadas con MWCNTs. Para dicho estudio, calculamos la velocidad media de migración de las células por medio de análisis de seguimiento de trayectorias celulares (ver materiales y métodos). El estudio lo llevamos a cabo en las líneas celulares de cáncer antes mencionadas: células HeLa, SH-SY5Y, U87MG y células obtenidas de especímenes quirúrgicos de glioblastoma multiforme (GBM). Incubamos estos cultivos con 25 µg/mL MWCNTs durante 70 h y realizamos vídeos de seguimiento de las células durante 5 h, los cuales, tras un análisis posterior, nos permitieron determinar la trayectoria y la velocidad de migración de cada célula (ver materiales y métodos). Los resultados obtenidos mostraron que la velocidad de migración media de las células HeLa tratadas con MWCNTs se veía reducida en más de un 40% respecto al control, siendo la diferencia estadísticamente significativa. También demostramos que existe una reducción de la velocidad de migración estadísticamente significativa para las otras dos líneas celulares de cáncer así como en las células derivadas de explante de glioblastoma tratadas con nanotubos de carbono resultando en una reducción de la velocidad de hasta un 18% (tabla 3).

Tipo celular	Velocidad cels. control (nm/s)	Velocidad cels. MWCNTs (nm/s)	Reducción de la velocidad	DF	t/p	Significado (%)
HeLa	12.7 ± 0.6	7.4 ± 0.4	41 %	245	7.2/ <10 ⁻¹⁰	>99.99
SH-SY5Y	8.7 ± 0.7	6.8 ± 0.4	22 %	114	2.3/ 0.02	95-98
U87MG	8.5 ± 0.2	6.1 ± 0.2	28 %	249	7.1/ <10 ⁻¹⁰	>99.99
GBM	9.2 ± 0.2	7.5 ± 0.1	18.5 %	408	6.5/ <10 ⁻⁹	>99.99

Tabla 3. Efecto inhibitor de la migración de los MWCNTs en diferentes tipos de células cancerosas. DF = grados de libertad; t/p = test *t* de Student. En todos ellos se observa una considerable reducción de la velocidad, siendo especialmente importante en las células HeLa con un 41%.

Ante estos datos cabe destacar que existe una reducción de la velocidad causada por los MWCNTs en todos los tipos celulares analizados, aunque también es cierto que esta reducción es diferente en función del tipo celular, probablemente debido a las características morfológicas y fisiológicas diferenciales de cada uno de ellos. Puesto que no todas las células son iguales, la capacidad de penetración y daño de los MWCNTs es diferente.

El efecto antimigratorio de los MWCNTs es dependiente de la dosis

Una vez determinado que los MWCNTs tienen efecto en la velocidad de migración de las células cancerígenas, nos planteamos si este hecho tenía lugar dependiendo de la dosis de MWCNTs. Para el estudio tratamos todas las líneas celulares y los cultivos primarios de células con: 0, 25 y 50 µg/mL de MWCNTs durante 70 h. Este análisis confirmó una reducción estadísticamente significativa de la velocidad, de hasta el 62%, con una dosis de 50 µg/mL (tabla 4). Dosis más altas (75 µg/mL) provocaron un efecto citotóxico masivo, lo que sugiere que este exceso de MWCNTs probablemente interfiera con algún otro proceso biológico crítico celular que conduce a la muerte de la célula.

Tipo celular	Velocidad control nm/s	Velocidad 25µg/mL MWCNTs nm/s	Velocidad 50µg/mL MWCNTs nm/s	Reducción
SH-SY5Y	8.7 ± 0.7	6.8 ± 0.4	3.3 ± 0.2	62%
U87MG	8.5 ± 0.2	6.1 ± 0.2	3.3 ± 0.2	61%
GBM	9.2 ± 0.2	7.5 ± 0.1	5.1 ± 0.4	48%

Tabla 4. Efecto inhibidor de la migración de los MWCNTs dependiente de la dosis en células tumorales malignas de origen neuroepitelial.

Por lo tanto, queda de manifiesto que los MWCNTs interfieren en la migración de las células, reduciéndola considerablemente, y que además este efecto antimigratorio es dosis-dependiente.

4.5 LOS MWCNTs INTERFIEREN CON LA UBICACIÓN DEL CENTROSONA Y EN LA TRAYECTORIA DE LAS CÉLULAS

Tras el resultado obtenido anteriormente, en el que se demuestra el efecto de los nanotubos sobre la velocidad de migración de las células, decidimos investigar el mecanismo molecular que lo desencadena. Como regla general, las células que migran muestran una morfología polarizada (Luxton & Gundersen, 2011) determinada por el llamado eje núcleo-centrosomal (figura 34). Este eje, identificado por primera vez por Van Beneden en 1880, contribuye a la organización asimétrica de la estructura celular durante la migración y se corresponde con la dirección final del desplazamiento (Van Beneden, 1883). Los microtúbulos, tiran hacia adelante del centrosoma arrastrando al núcleo, por lo que el centrosoma va delante y el núcleo detrás durante la migración de la célula. Por consiguiente, en células que migran sobre sustratos 2D, el centrosoma se coloca típicamente entre el núcleo y el borde de la célula que comienza el avance, existiendo una estrecha relación entre la dirección de la migración celular y el eje núcleo-centrosomal (figura 34, flechas).

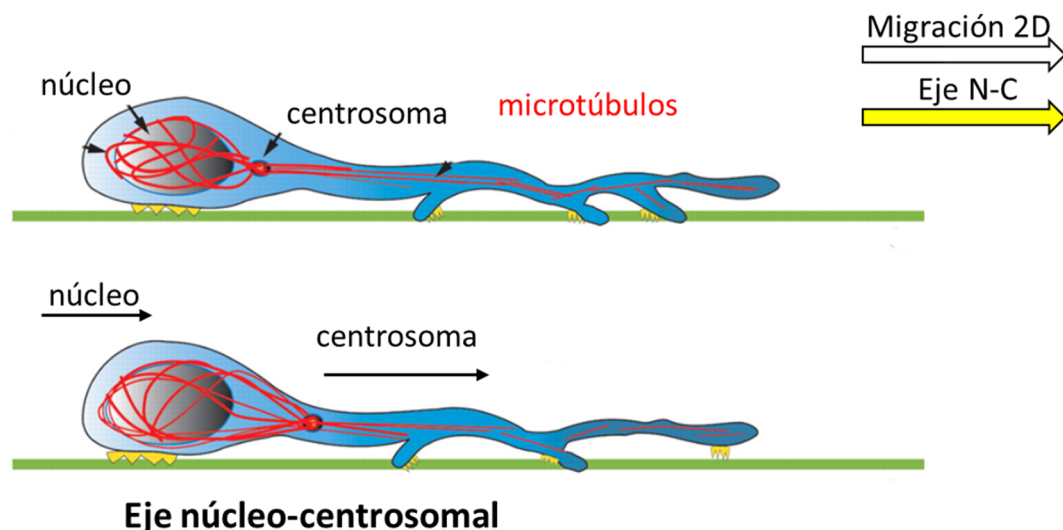


Figura 34. Esquema de la disposición del eje núcleo-centrosomal (N-C) durante la migración celular. Se puede apreciar la disposición de una célula en migración 2D, donde los microtúbulos tiran hacia delante del centrosoma arrastrando al núcleo. Este hecho hace que las células que migran muestran una morfología polarizada determinada por este eje núcleo-centrosomal. Existe un paralelismo entre la dirección de la migración de la célula (flecha blanca) y el eje núcleo centrosomal (flecha amarilla). Adaptación de Solecki *et al*, 2006 .

Para determinar la orientación del eje núcleo-centrosomal en células expuestas a MWCNTs transfectamos las células HeLa con EB1:GFP para marcar con fluorescencia verde el centrosomas y teñimos los núcleos con Hoechst (canal azul). Utilizando el microscopio de célula viva (Nikon Eclipse Ti *live-cell station*), con el objetivo de 20x y la fluorescencia (ver materiales y métodos) realizamos vídeos de estas células *in vivo*, que nos permiten el estudio de la posición y trayectoria del centrosoma en la migración. En la figura 35 se pueden observar imágenes procesadas a partir de estos vídeos, donde se aprecia como en las células control los centrosomas se colocan a lo largo del eje núcleo-centrosomal, entre el núcleo y el borde delantero de la célula, tal como fue descrito por Van Beneden. Sin embargo, los centrosomas de las células tratadas muestran una ubicación aleatoria perinuclear y se colocaban ectópicamente con respecto a la trayectoria nuclear, independientemente de la dirección de migración de las células, siendo en muchos casos completamente opuesta.

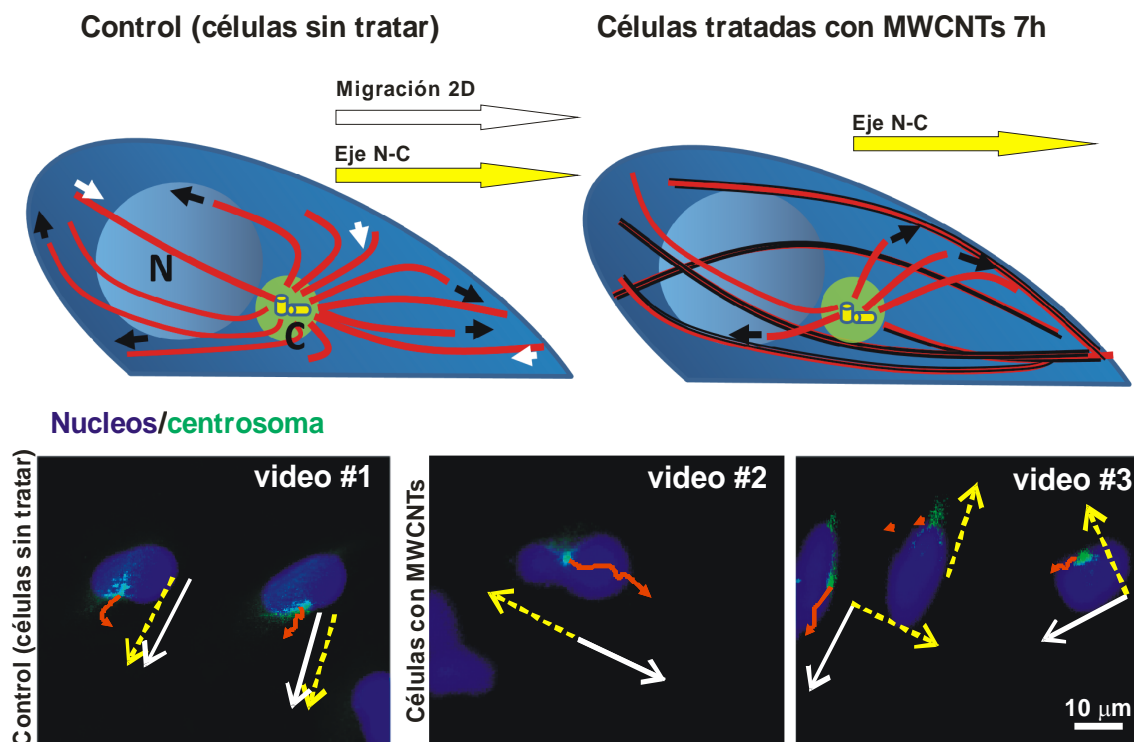


Figura 35. Los MWCNTs descolocan el centrosoma con respecto al eje núcleo-centrosomal en células HeLa. Arriba: Diagrama de la disposición del núcleo (N), centrosoma (C) y la matriz de microtúbulos (filamentos rojos) en el control y en las células tratadas con MWCNTs (en negro) durante la migración. También se indica la polaridad de la célula y la dirección migratoria (flecha blanca) en relación con el eje núcleo-centrosomal (N-C) (flecha amarilla). Abajo: Imágenes resumen de las trayectorias obtenidas mediante video microscopía *time-lapse* de la migración de células HeLa donde se aprecian los núcleos (azul), los centrosomas (verde), así como las trayectorias centrosomales (flechas rojas), celulares (flechas blancas) y de los ejes núcleo-centrosomales (flechas amarillas).

Este resultado pone de manifiesto que los MWCNTs interfieren en la ubicación del centrosoma en las células cancerígenas humanas dando lugar a un efecto anti-migratorio importante. Se podría discutir si la presencia de nanotubos de carbono formando una película sobre el sustrato de crecimiento de las células podría interferir con los procesos de migración celular. Sin embargo, nuestras condiciones de funcionalización hacen altamente improbable que los MWCNTs se depositen en el sustrato de crecimiento. De hecho, estudios recientes han mostrado que los nanotubos de carbono pueden llegar a facilitar la migración celular (Bédier *et al*, 2012). Este resultado enfatiza las propiedades antineoplásicas de los nanotubos puesto que la inhibición de la migración de las células cancerígenas impediría la invasión tumoral a otros tejidos.

4.6 EL MELANOMA COMO MODELO TUMORAL

Una vez que hemos evaluado los efectos citotóxicos, antiproliferativos y antimigratorios de los nanotubos de carbono *in vitro*, en distintas líneas celulares de cáncer humano, el siguiente objetivo que nos planteamos era la validación de estos resultados en tumores sólidos.

Como modelo para desarrollar este estudio elegimos el melanoma. El melanoma es un tipo de cáncer de piel que aparece cuando las células llamadas melanocitos se convierten en células malignas. Es uno de los cánceres cutáneos más frecuente y que ha sufrido un crecimiento exponencial en varios países europeos recientemente, superando el 2% de incidencia anual (Balch *et al*, 2009). En nuestro país la incidencia se puede considerar alta (tasa ajustada mundial en 2002: 5,3 nuevos casos/100.000 habitantes/año en hombres y 5,5 en mujeres), con un ascenso muy importante, especialmente desde los años 90. Es más común en los adultos, pero a veces se encuentra en niños y adolescentes. La mayoría de los melanomas se desarrollan en la piel aunque existen otras localizaciones como el ojo, la mucosa oral o genital. Su comportamiento biológico es característico, ya que primero existe un crecimiento intra-epidérmico o radial y luego un crecimiento dérmico o vertical. Es en esta fase de crecimiento dérmico cuando el melanoma puede producir metástasis. El mejor tratamiento actual de los melanomas es su pronóstico precoz y la extirpación quirúrgica, porque tratamientos como la quimioterapia, radioterapia, inmunoterapia o terapias dirigidas tienen un valor paliativo no curativo.

La terapia con nanotubos de carbono en este modelo de cáncer permitiría reducir los riesgos de metástasis y disminuir los márgenes de la resección del tumor, que deben de ser entre 0.5 a 2 cm, que dependiendo de la zona del cuerpo donde se localice, pueden representar un grave problema funcional y estético para el paciente. Además, al tratarse de un carcinoma sólido que se produce en la piel hace más fácil su estudio por su excelente accesibilidad y visibilidad, no sólo para su detección sino para su tratamiento con nanomateriales a nivel local.

Para el estudio decidimos desarrollar un modelo tumoral novedoso de melanoma murino maligno B16F10. Estas células trasplantadas producen tumores sólidos de coloración oscura, lo cual ofrece grandes ventajas para su estudio, debido

a que son fáciles de reconocer y permitiendo el uso tópico (tratamiento externo o local) de los MWCNTs.

4.6.1 Estudios *in vitro* de las células de melanoma

Las células de melanoma maligno se caracterizan por ser muy agresivas, en general desarrollan resistencia a taxol® y tienen capacidad de metastatizar produciendo nódulos pigmentados visibles en pulmones, hígado, piel y diafragma (Hart, 1979). Debido a sus características malignas, el primer estudio que decidimos llevar a cabo es evaluar los efectos antineoplásicos de los MWCNTs en estas células *in vitro*.

4.6.1.1 Los MWCNTs penetran en el interior de las células de melanoma maligno

En primer lugar confirmamos la entrada y presencia de MWCNTs en el interior de estas células mediante dos técnicas. Por un lado, usamos TEM en secciones de células de melanoma tratadas con MWCNTs como se muestra en la figura 36, donde se ven haces de estos nanotubos de carbono dentro del citoplasma de las células.

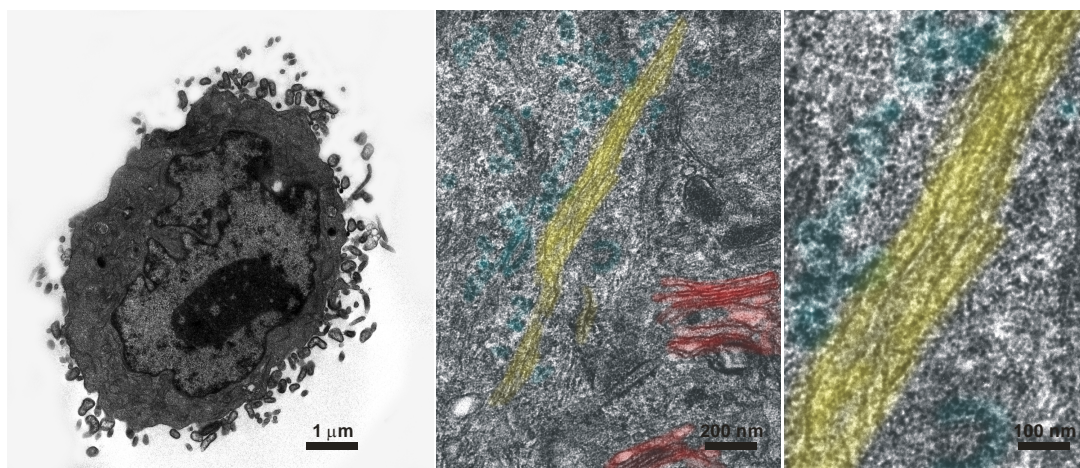


Figura 36. Detección de MWCNTs dentro de las células de melanoma maligno. Imagen TEM de una célula de melanoma tratada *in vitro* con MWCNTs. Imagen de microscopía electrónica de una sección del citoplasma de una célula de melanoma donde se observan MWCNTs, el golgi y las regiones ricas en ribosomas pseudo-coloreadas en rojo y azul respectivamente.

La presencia de MWCNTs intracelulares se mostró también usando espectroscopía Raman confocal enfocando el haz de láser de $1\mu\text{m}^2$ dentro del citoplasma celular usando los espectros Raman de MWCNTs originales y del citoplasma de células no tratadas como controles (figura 37). Podemos observar las bandas típicas para MWCNTs en el espectro obtenido de la parte intracelular de células tratadas con MWCNTs junto con picos que corresponden a las proteínas celulares.

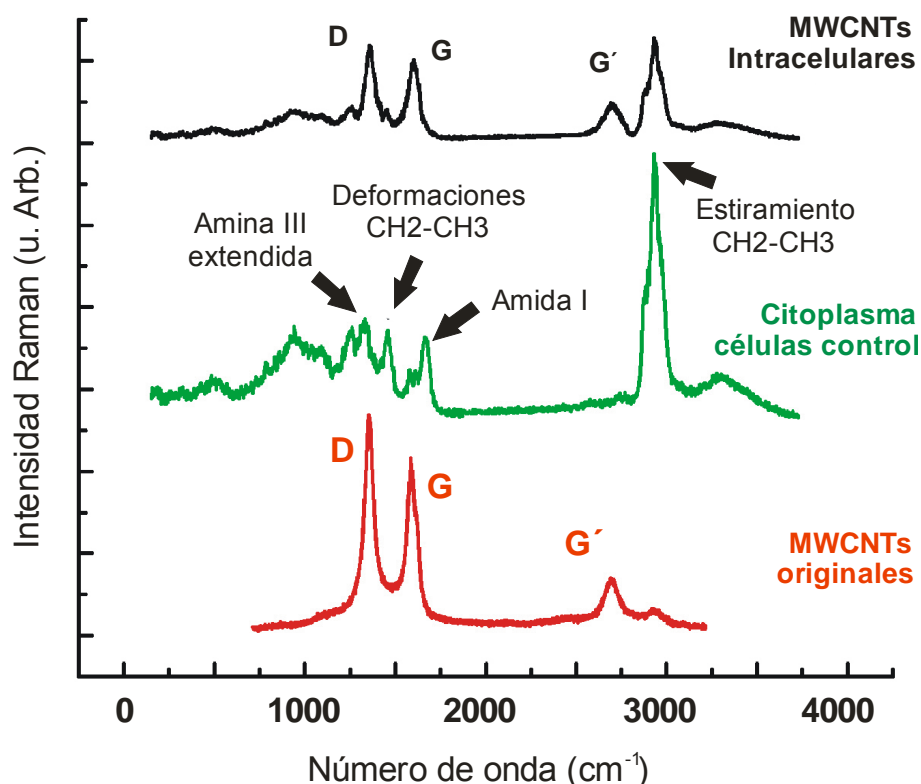


Figura 37. Detección de MWCNTs dentro de las células de melanoma maligno. Gráfica de espectroscopía Raman para MWCNTs originales (rojo), del citoplasma de una célula no tratada como control (verde) y del citoplasma de una célula de melanoma tratada con MWCNTs durante 48 h (negro). Los espectros de MWCNTs originales muestran las bandas típicas indicadas como D, G, y G'. Estos picos son específicos de MWCNTs que también se observan en el espectro obtenido a partir del interior de las células tratadas con MWCNT (negro) junto con picos característicos que corresponden a las proteínas celulares, confirmando la presencia de MWCNTs en el citoplasma.

4.6.1.2 Efecto citotóxico en las células de melanoma maligno

Cuando expusimos las células a altas dosis ($100\text{ }\mu\text{g/mL}$) de MWCNTs pudimos observar, por microscopía de contraste de fases, un claro efecto citotóxico de los MWCNTs (figura 38), además de una disminución significativa de la población

celular. Sin embargo, en esta línea celular, es necesario una dosis más alta de nanotubos de carbono para producir efectos citotóxicos evidentes. Si bien en las líneas celulares utilizadas hasta ahora, con 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de MWCNTs ya existían claras evidencias de citotoxicidad, en el caso de las células de melanoma se necesitan unos 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de MWCNTs y exposiciones de 70 h para apreciar el efecto citotóxico. Probablemente este resultado sea debido a sus características agresivas o capacidad de metastatizar, que les confieren una mayor resistencia ante agentes citotóxicos.

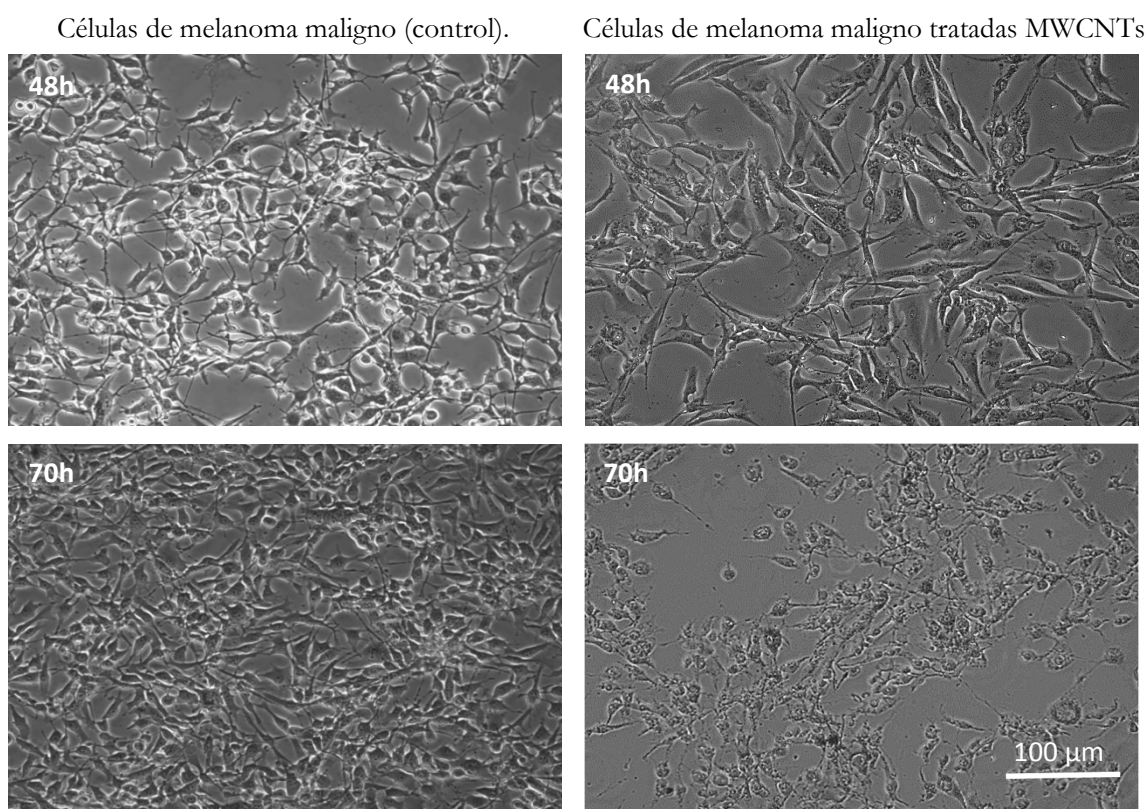


Figura 38. Imágenes de contraste de fases de células de melanoma maligno control (izquierda) y tratadas con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de MWCNTs (derecha). A las 70 h de tratamiento queda de manifiesto el efecto citotóxico de los MWCNTs sobre estas células.

Este resultado también se investigó por microscopía confocal. Las células tratadas con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de MWCNTs presentaban mayor tamaño debido a procesos de bloqueo en la mitosis seguidos de deslizamiento mitótico. Además, también se observa una red de microtúbulos mal organizada (figura 39), todo ello fenotipos típicos de las células tratadas con nanotubos de carbono.

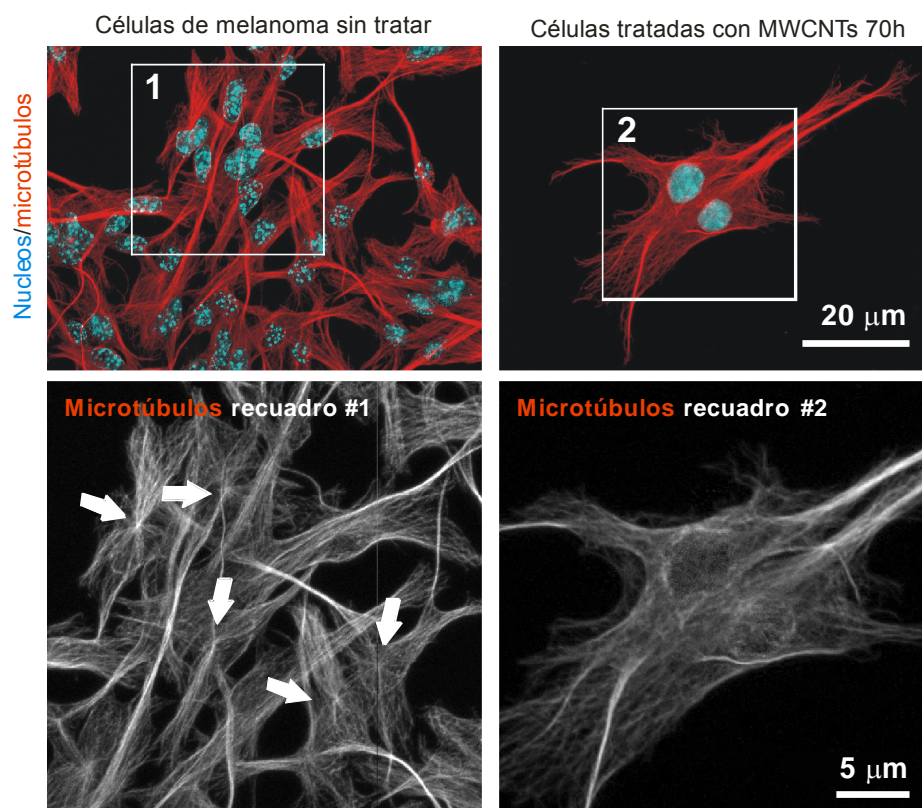


Figura 39. Los MWCNTs muestran efectos antineoplásicos *in vitro* en células de melanoma maligno. Arriba: Imágenes de microscopía confocal de células de melanoma donde se ha realizado una inmunocitoquímica para marcar los núcleos (canal azul) y los microtúbulos (canal rojo). Las células tratadas con MWCNTs (derecha) son de mayor tamaño y muestran desorganización de la red microtubular. Abajo: Ampliación de los microtúbulos del citoesqueleto. Las células de melanoma no tratadas (recuadro 1) muestran una organización de microtúbulos radial con los centrosomas visibles en mayoría de las células (flechas). Sin embargo, las células tratadas con MWCNTs (recuadro 2) son de mayor tamaño y muestran una red de microtúbulos desorganizada donde no se observan los centrosomas.

4.6.1.3 Efecto antiproliferativo en células de melanoma maligno

Para valorar los posibles efectos antiproliferativos de los nanotubos de carbono en células de melanoma, determinamos si el tiempo que tardan las células en dividirse se veía afectado tras el tratamiento con MWCNTs. Para ello cuantificamos el tiempo de división mediante video microscopía de célula viva (detallado en materiales y métodos). Para más de 270 células el análisis estadístico de los resultados mostró que el tratamiento con MWCNTs aumentaba el tiempo de división en un 20% con respecto al de las células no tratadas. Además, también se observaron divisiones celulares asimétricas o procesos de bloqueo mitótico seguidos de fenómenos de

deslizamiento mitótico que típicamente dan lugar a células de mayor tamaño o poliploidías (figura 40).

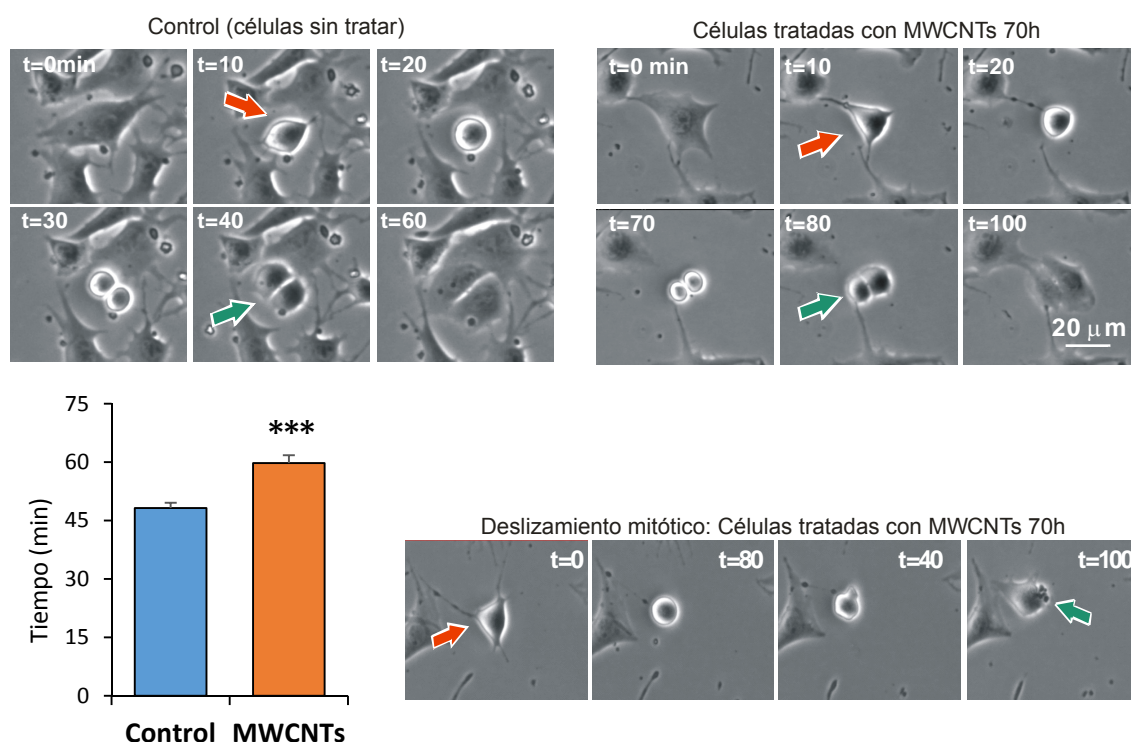


Figura 40. Los MWCNTs retardan la proliferación de las células de melanoma maligno. Arriba: fotogramas del vídeo del ciclo de división de las células de melanoma (tratadas y sin tratar) desde la metafase (flecha roja) a telofase (flecha verde). Los intervalos de tiempo para cada fotograma se muestran en la parte superior de cada imagen. Las células del melanoma expuestas a MWCNTs retardan significativamente la división celular. Abajo derecha: fotogramas del ciclo mitótico de células tratadas con MWCNTs. Estas células escapan del bloqueo mitótico mediante un mecanismo conocido como "deslizamiento mitótico". La poliploidía es el resultado de este proceso de resistencia empleado frecuentemente por células cancerosas expuestas a fármacos estabilizadores de microtúbulos como el taxol®. Abajo izquierda: Gráfico con los tiempos de división de células control y tratadas, siendo la diferencia de tiempos estadísticamente significativa ($t = 4,088$; $n = 270$; nivel de confianza del 99,9%).

4.6.1.4 Efecto antimigratorio en células de melanoma maligno

Lo siguiente que nos planteamos analizar fue la velocidad de migración de las células de melanoma tratadas con MWCNTs. Para ello se grabaron células tratadas durante 70 horas. Posteriormente calculamos mediante "cell tracking" la velocidad de migración de cada célula (ver materiales y métodos). Los resultados obtenidos para más de 170 células muestran que los MWCNTs provocan una reducción de la velocidad del 15%, es decir, como en modelos celulares anteriormente estudiados *in*

vitro, los nanotubos de carbono ejercen un efecto antimigratorio en las células de melanoma maligno murino.

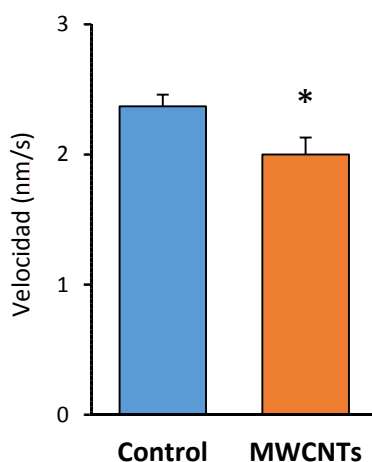


Figura 41. Las células tratadas con MWCNTs reducen su velocidad de migración. ($t = 2,4$; $n = 176$; la confianza de nivel es del 98%).

Todos los fenotipos que se detectan en estas células de melanoma maligno como la desorganización de la red de microtúbulos o el agrandamiento celular son indicativos de la interacción biomimética de MWCNTs con el citoesqueleto. También aquí los MWCNTs tienen un efecto anti-proliferativo, así como un efecto antimigratorio en las células tratadas. En resumen, estos resultados muestran la susceptibilidad de las células de melanoma maligno al efecto antineoplásico intrínsecos de los MWCNTs *in vitro*.

4.7 DESARROLLO DE MODELOS TUMORALES SÓLIDOS

Corroborados los efectos antineoplásicos de los MWCNTs *in vitro* en varias líneas celulares, el siguiente de los objetivos que nos marcamos fue validar los resultados *in vivo*, en tumores sólidos de melanoma maligno. Para tal fin era necesario el desarrollo de un modelo tumoral, fácilmente identificable, cuantificable y reproducible.

Actualmente los efectos de las nanomedicinas en cáncer se investigan *in vitro* en sistemas de cultivo de células 2D y 3D de diferentes células cancerosas. Estos

modelos son una forma rápida, razonablemente eficiente, barata y reproducible de evaluar nuevas terapias anti-proliferativas o citotóxicas. Sin embargo, la bibliografía demuestra cómo muchas terapias validadas *in vitro* no se comportan de forma esperable en tumores reales. La principal razón de este fracaso es el hecho de que los tumores no son sólo simples masas desorganizadas de células tumorales, sino que tienen una organización celular compleja en la que las células cancerosas son sólo una pequeña proporción de todas las células en el órgano tumoral.

Los modelos de trasplante son una estrategia alternativa para la evaluación real de terapias anti-cáncer. Estos estudios se realizan a menudo en xenotrasplantes en huevos embrionados de especies como el pez cebra o los de pollos. Estos sistemas son de bajo coste y no necesitan de requisitos bioéticos especiales.

4.7.1 Tumores de melanoma generados en embriones de pollo *ex ovo*

Con el objetivo de ver el comportamiento antineoplásico de los nanotubos de carbono en tumores, en primer lugar estudiamos el modelo de xenotrasplantes de células de melanoma maligno de ratón en embriones de pollo *ex ovo*. Se emplea el embrión de pollo como modelo por sus innumerables ventajas. Las primeras fases de cría proporcionan un entorno adecuado para la génesis tumoral. Tras el desarrollo de la membrana corioalantoidea del pollo, la red de vasos sanguíneos existentes es fácilmente observable y manipulable, por lo que proporciona un sustrato ideal para el crecimiento tumoral. Dado que el sistema linfático del pollo no se desarrolla completamente hasta las últimas etapas de incubación, es un perfecto huésped inmunodeficiente que no presentará rechazo frente a xenoinjertos, y que además, la red de vasos da lugar a un entorno único para la intravasación de las células tumorales y la difusión para llegar a formar micro focos metastásicos (Dohle *et al*, 2009). También, permite la aplicación de MWCNTs (o fármacos) resuspendidos de forma tópica. En este contexto, llegamos a obtener embriones creciendo en placas de cultivo durante 15-17 días, donde se podía apreciar el desarrollo del embrión durante este tiempo (figura 42).

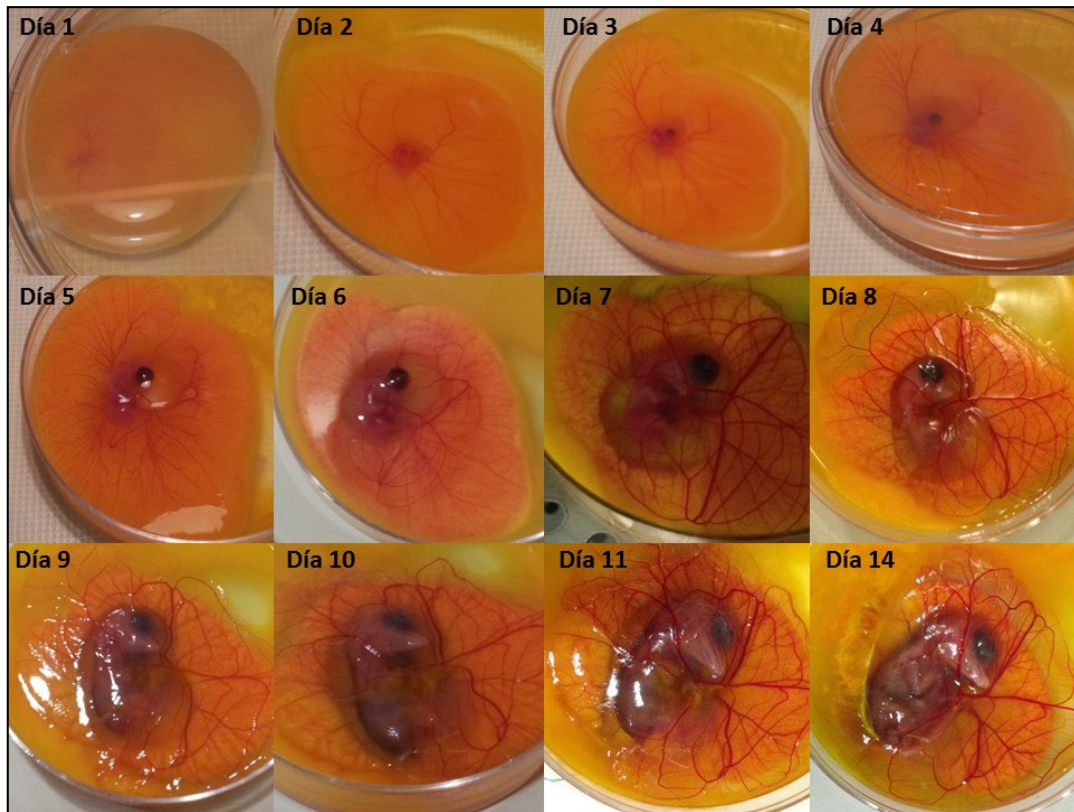


Figura 42. Etapas de crecimiento del embrión de pollo *ex ovo*. Imágenes tomadas del embrión del pollo desde el día de cascado y depósito en la placa de cultivo (día 1). Se puede apreciar el crecimiento y desarrollo del embrión en una placa de cultivo.

Las células de melanoma maligno se trasplantaban en la membrana corioalantoidea que está ampliamente vascularizada. Se desarrollaban pequeños tumores a los que posteriormente tratábamos con MWCNTs (figura 43).

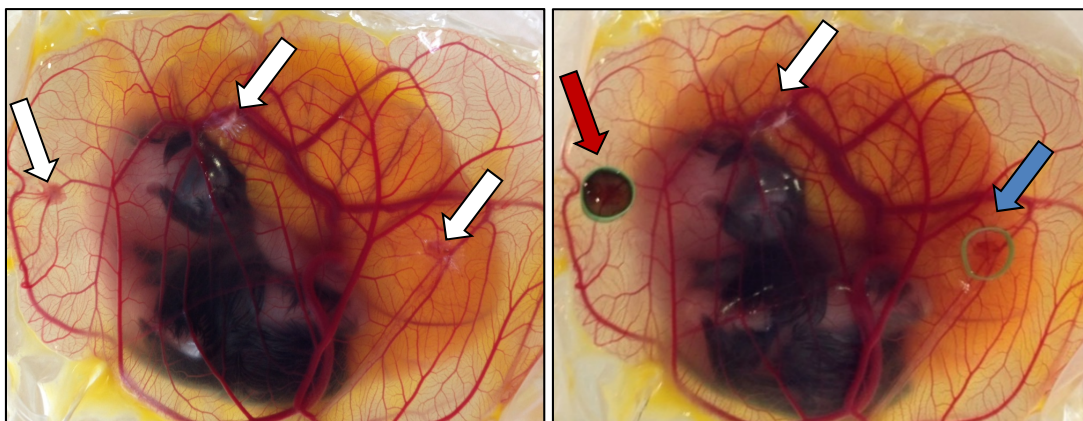


Figura 43. Embrión de pollo *ex ovo* donde se generaron pequeños tumores de melanoma. Izquierda: embrión con tres tumores de melanoma (flechas blancas) crecidos a los 5 días de inyectar las células. Derecha: mismo embrión con los tres tumores dignos de estudio, tratados con MWCNTs (flecha roja), sin tratar (flecha blanca) y tratado con medio sin nanotubos de carbono como control (flecha azul).

Sin embargo, este sistema es poco reproducible y resulta en una baja tasa de supervivencia, siendo mínimo el crecimiento tumoral, masas de unos 5 mm de diámetro, debido a lo cual no permite un estudio sistemático para la correcta evaluación estadística. Además, los márgenes de tiempo no son favorables, ya que apenas existe tiempo para comenzar el tratamiento desde que se inyectan las células y el tumor es visible. Debido a estos inconvenientes este modelo fue descartado y decidimos desarrollar otro modelo animal.

4.7.2 Tumores de melanoma generados en ratones neonatos

Los modelos de mamíferos son más interesantes desde el punto de vista terapéutico y farmacológico. Su fisiología, su temperatura corporal o su farmacodinamia puede extrapolarse razonablemente a los seres humanos. Al igual que con el método anterior, también hay muchas alternativas, beneficios y limitaciones de estos sistemas modelo. El más simple consiste en el trasplante de tejidos tumorales o células en un receptor de acogida de antecedentes genéticos idénticos. Este tipo de trasplante se denomina trasplante de aloinjerto. La principal ventaja de este enfoque experimental, típicamente realizado en ratones, es la presencia de un sistema inmune del huésped normal, que no rechaza el tejido. Paradójicamente, la principal ventaja de este sistema es también la principal desventaja ya que los tejidos de cáncer y el huésped deben compartir un fondo genético común y por lo tanto, este modelo se limita a trasplantes de aloinjerto de la misma especie, es decir, el tejido murino a huéspedes murinos, mostrando una rechazo sistemático de las células cancerosas humanas.

El trasplante de xenoinjerto también se utiliza en ratones. Los ratones receptores, deben tener una alteración en el sistema inmunológico de modo que las células o los tejidos trasplantados externos no sean rechazados. Estas técnicas de xenotrasplantes se realizan normalmente en ratones inmunodeprimidos (Kelland, 2004; Ahn *et al*, 2008; Tomayko & Reynolds, 1989). Dichos ratones son sistemas modelo de cáncer de mamífero, puesto que no hay rechazo y existe un desarrollo completo de los órganos tumorales. Pero también existen ciertas desventajas en estos modelos como son: el coste de la adquisición y el alojamiento y cuidado de estos ratones ya que son altamente susceptibles a las infecciones virales y bacterianas

oportunistas. Además, la inmunodeficiencia en estos ratones no imita a la situación micro-ambiental del tumor real y el crecimiento tumoral en estos modelos es lento, requiriéndose de 3 a 6 semanas (Kyriazis *et al*, 1978).

Valorando todos estos pros y contras mencionados, desarrollamos una nueva técnica para generar órganos tumorales. Consiste en un trasplante de aloinjerto de las células tumorales melanocíticas en ratones neonatos. Este sistema posee numerosas ventajas: es un sistema de mamíferos donde no hay rechazo, existe un desarrollo completo del órgano tumoral, es plenamente reproducible, fácilmente accesible por ser en la piel e identificable por poseer pigmentación negra (lo cual permite el uso tópico de los nanotubos de carbono) y además, es rápido (los tumores se desarrollan entre 6-10 días), fácil y de bajo coste (se utilizan ratones albinos normales).

4.7.2.1 Procedimiento de trasplante

Dado que el número de crías por camada influye de manera significativa en las condiciones de velocidad del desarrollo de éstas y por lo tanto en el tamaño final del tumor, este artefacto, inherente al sistema *in vivo*, se reduce haciendo de cada camada un experimento independiente. Es decir, todos los hermanos de camada se inyectan simultáneamente siguiendo procedimientos idénticos. Unas 2×10^5 células de melanoma se trasplantan mediante inyección en la zona subcutánea intra-escapular del ratón neonato. Una vez que los tumores se han desarrollado, cada camada es dividida en dos mitades: una mitad como control y la otra mitad como objeto del tratamiento deseado de estudio (figura 44). Este procedimiento reduce al máximo el ruido inherente del sistema de cribado *in vivo*, reduciendo al máximo la variabilidad estadística no específica.

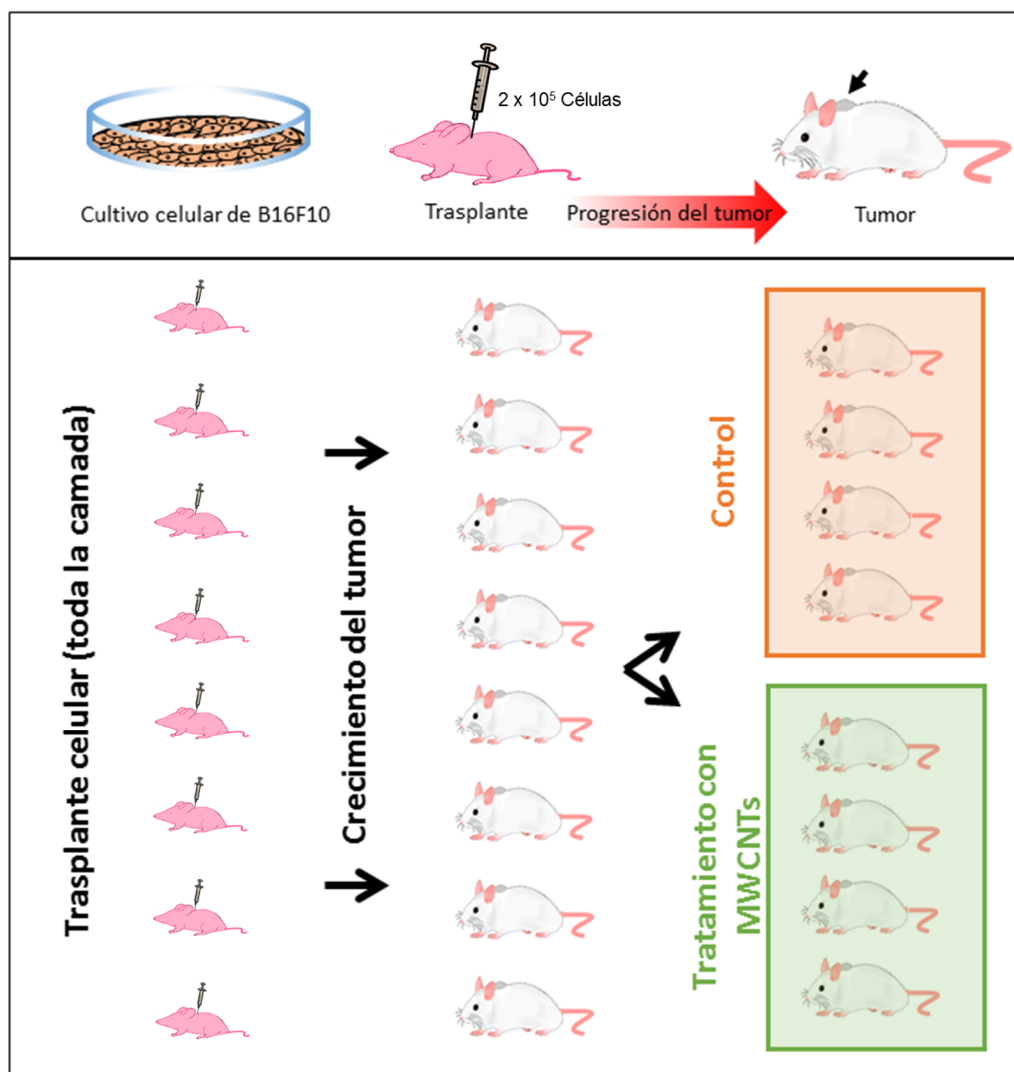


Figura 44. Esquema representativo del diseño experimental tumores melanocíticos generados en ratones. Arriba: Pasos en el desarrollo de los órganos del tumor. La línea celular de melanoma murino se crece y amplifica *in vitro*. Después tiene lugar el trasplante interescapular subcutáneo de 2×10^5 células de melanoma en el ratón hospedador. Pasados unos días hay una progresión del tumor y se puede analizar la localización del tumor sólido pigmentado y su identificación (flecha). Abajo: Diseño experimental. Una camada entera se utiliza para cada experimento. Todos los ratones de la camada se trasplantan siguiendo procedimientos idénticos. Después, los ratones portadores de tumores visibles se dividen aleatoriamente en dos grupos: uno para el tratamiento con MWCNTs y otro como control.

El sistema inmunológico poco desarrollado de estos ratones junto con la abundancia de factores de crecimiento y las condiciones hormonales en sus tejidos garantizan un entorno tumoral perfecto para dar lugar a tumores pigmentados sólidos que se desarrollan en 6-10 días (figura 45). Las masas tumorales se pueden observar entre los 2-4 días post-trasplante a través de la piel en animales vivos.

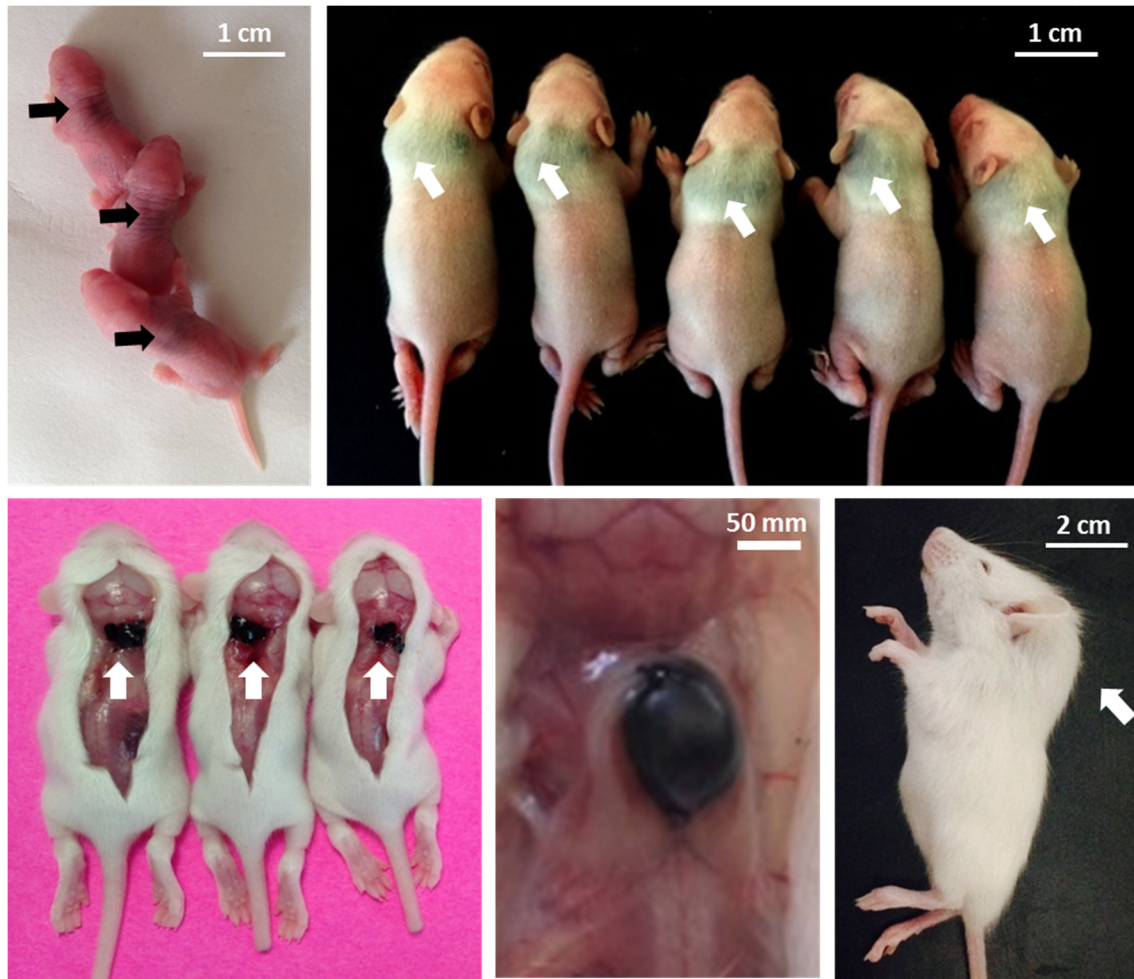


Figura 45. Desarrollo del tumor en ratones. Arriba a la izquierda se observan ratones con 4 días post-trasplante, las flechas apuntan al punto de inyección. A la derecha se puede ver ratones con tumores pigmentados visibles. Abajo a la izquierda: evaluación macroscópica de los tumores generados, mostrando la ubicación y las características macroscópicas de varios tumores de melanoma en ratones hermanos de camada de 12 días de edad (5 días post-trasplante). Los tumores pigmentados negros los hacen fácilmente identificables para su tratamiento como para la evaluación anatomopatológica. Abajo centro: imagen de uno de un tumor de melanoma *in situ*. A la derecha un ratón postnatal 15 con un tumor de melanoma sólido (flecha).

A medida que el ratón que ha recibido el trasplante crece se desarrolla su sistema inmunológico, lo que interfiere en la tasa de crecimiento del tumor. Por lo que para escoger el tamaño del tumor final más adecuado, es importante evaluar el crecimiento de los órganos tumorales durante diferentes períodos de tiempo. También podemos realizar una monitorización sencilla día a día directa de las masas tumorales en tiempo real para las pruebas de terapia, así como también para la caracterización y evaluación mediante técnicas convencionales.

4.7.2.2 El tamaño depende de la edad del trasplante y los días de crecimiento

Macroscópicamente estas masas tumorales están generalmente bien encapsuladas, vascularizadas, y tienen tamaños variables dependiendo de dos factores clave como son: la edad del trasplante y los días de crecimiento. Así los órganos tumorales pueden variar de tamaño desde 2-500 mg. La figura 45 muestra la variabilidad esperada para las masas tumorales finales de acuerdo con lo observado.

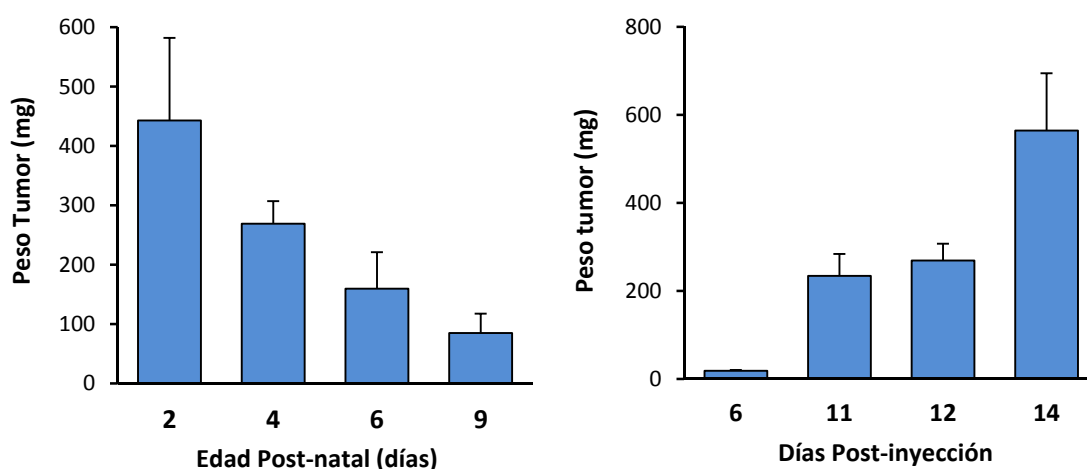


Figura 46. Tamaño tumoral en función de la edad del ratón y los días de trasplante. Izquierda: El histograma representa los tamaños de los tumores en relación a la edad del ratón cuando se realiza el trasplante. Derecha: en este caso el histograma representa los tamaños finales de los tumores resultado del trasplante en el ratón el día postnatal 4, en relación a los días que se les ha permitido desarrollarse, en este caso 6, 11, 12 y 14 días.

A la vista de los resultados obtenidos en la figura 46 quedan de manifiesto dos aspectos claros. Por una parte, que la edad del ratón al ser trasplantado es vital para obtener tumores sólidos reproducibles. Cuanto más joven el ratón, mayor será el tumor obtenido, más pequeños en ratones más viejos. La explicación a esta observación se ha mencionado anteriormente, a medida que el ratón crece disminuyen los factores de crecimiento y se va desarrollando su sistema inmunológico, por tanto, el tamaño del tumor cada vez es menor.

Por otra parte, se observa claramente que ratones a los que se les ha realizado el trasplante el mismo día de edad, por ejemplo el día 4, en función de cuantos días se deje crecer al ratón más grande será la masa tumoral (figura 46, derecha).

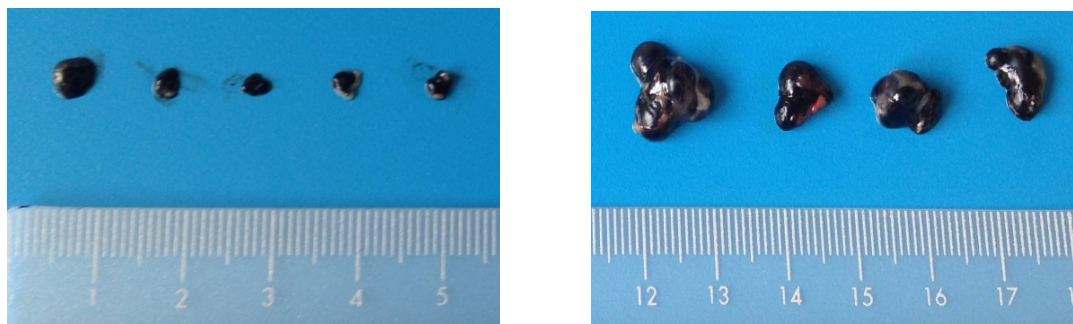


Figura 47. Tumores visibles de ratones post-natal 4 crecidos durante 6 y 14 días. Se observa la reproducibilidad de los tumores generados y la variabilidad de tamaño si se dejan crecer 6 días (izquierda) o 14 días (derecha).

Con estos resultados decidimos que el periodo ideal para obtener una adecuada masa tumoral en la que poder realizar una inyección intratumoral con MWCNTs fueron 7 días, en ratones post-natal 4.

4.7.2.3 El modelo tumoral es versátil y reproducible

Este sistema modelo de tumor sólido es muy versátil ya que permite las pruebas *in vivo* y la validación de tratamientos individuales o dosis repetidas de diferentes terapias. Además, estas terapias pueden ser aplicadas por todas las rutas posibles: intra-venosa, subcutánea, oral, intra-intramuscular, por inyección tumoral o por cualquier otra vía parenteral. Además, es altamente reproducible en comparación con la mayoría de los modelos tumorales 3D que a menudo producen masas de células tumorales que no son directamente comparables en diferentes individuos, sobre todo debido a los artefactos experimentales derivados de enfoques técnicos complejos. La figura 45 muestra el alto grado de reproducibilidad del sistema reduciendo al mínimo la variabilidad inherente de este tipo de experimentos.

4.7.2.4 Los órganos tumorales resultado del trasplante poseen características anatomo-patológicas propias de melanoma malignos

El examen anatomo-patológico e histológico de estos tumores lo llevó a cabo el doctor Fidel Fernández, médico especialista del servicio de Anatomía Patológica del Hospital Valdecilla y colaborador de nuestro grupo.

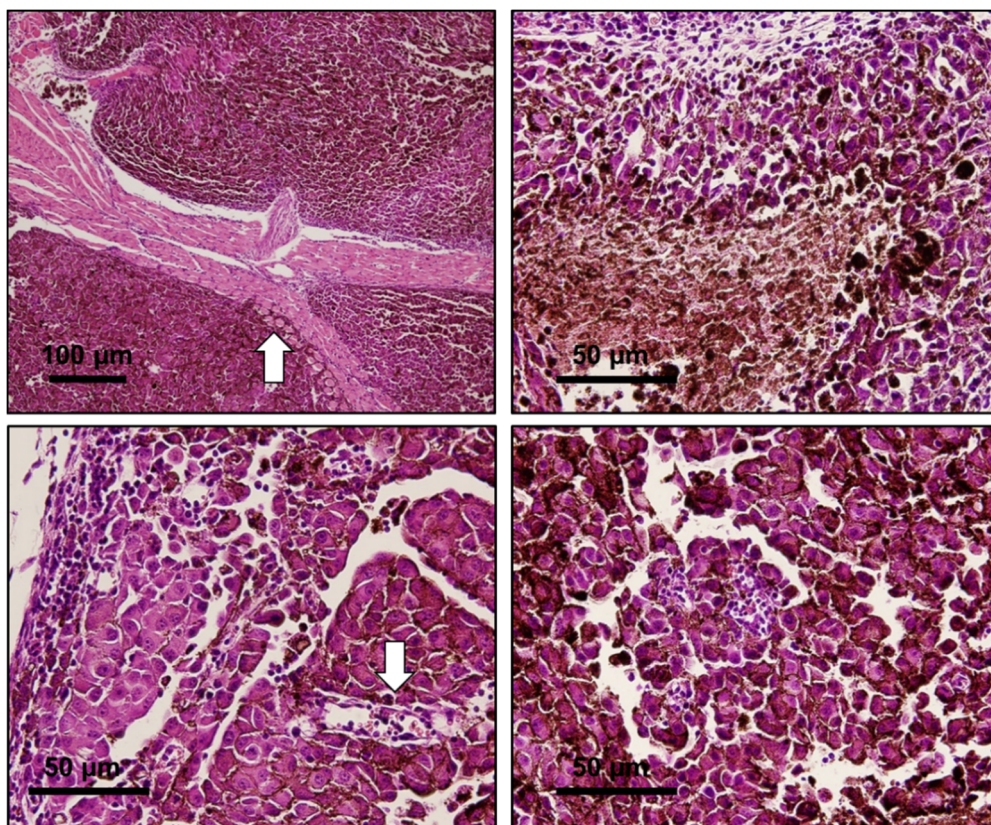


Figura 48. Exámenes histopatológicos de los tumores de melanoma generados. Arriba izquierda: Sección de hematoxilina-eosina del tumor que presentan características tumorales malignas típicas: como los bordes tumorales expansivos y neovascularización. Las células trasplantadas desarrollan la infiltración de masas de células tumorales con células epiteliales pigmentadas (flecha). Arriba derecha: se observa de cerca las masas de células pigmentadas dentro del órgano tumoral. Abajo izquierda: Detalle de la acantolisis (pérdida de conexiones intercelulares) que rodea los vasos sanguíneos pequeños cargados de eritrocitos (flecha). Abajo derecha: Estos tumores presentan un sólido patrón pseudo-papilar y acantolisis. Además de observarse una respuesta inflamatoria significativa, un alto índice mitótico y focos de necrosis intratumoral.

Las secciones tumorales muestran masas constituidas por células del parénquima de melanoma bien organizadas y pigmentadas que se entremezclan con otros múltiples tipos de células y componentes de la matriz extracelular, así como también neovascularización. Estos tumores tienen las características típicas de

melanoma maligno: alta tasa mitótica, focos de necrosis intratumoral, bordes de crecimiento expansivo e infiltración de los tejidos circundantes además de una respuesta inflamatoria significativa. En resumen, estos órganos tumorales son altamente representativos mostrando el fenotipo típico del cáncer.

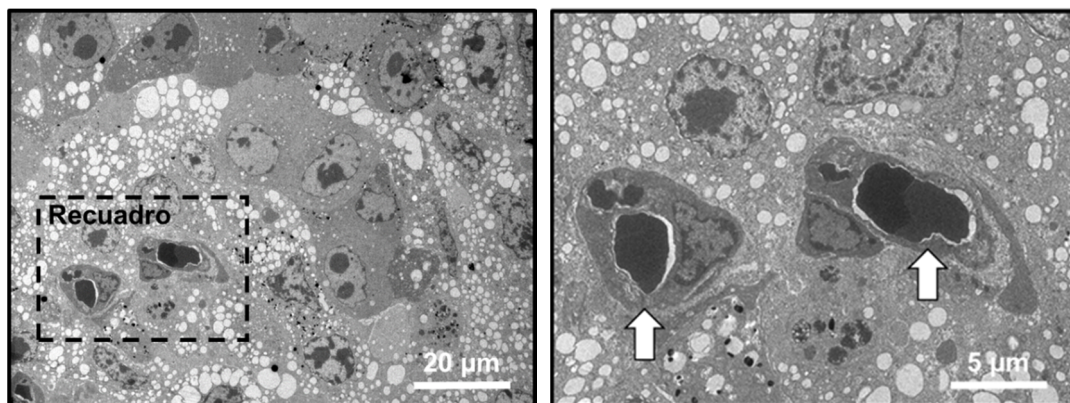


Figura 49. Sección de microscopía electrónica de un de los tumores de melanoma. Izquierda: se observa cómo se desarrolla un microambiente tumoral donde las células del parénquima se entremezclan con células de grasa, macrófagos y abundante neovascularura. Derecha: Detalle de los vasos sanguíneos intratumorales, las flechas señalan las secciones de glóbulos rojos visibles dentro de los neo-capilares.

4.8 LOS MWCNTs INHIBEN LA PROGRESIÓN DEL TUMOR *IN VIVO*

Una vez que hemos desarrollado tumores sólidos donde podemos estudiar el efecto de los nanotubos de carbono *in vivo*, decidimos abordar este estudio desde dos enfoques diferentes.

4.8.1 Tratamiento tumoral con MWCNTs en las células malignas

En este enfoque estudiamos cual era la dosis a la cual los MWCNTs no producen efecto citotóxico en las células de melanoma. Además, estimamos el tiempo necesario para que estos nanotubos de carbono se transtocasen al interior de las células. Para ello, tratamos a las células de melanoma maligno con distintas dosis de MWCNTs *in vitro* durante 48 horas. Mediante estudios de citometría y microscopía de contraste de fases comprobamos que la dosis permisiva eran 20 µg/mL. A esta dosis

los nanotubos no producen alteraciones en el ciclo de división celular ni daño citotóxico detectable (figuras 50 y 51).

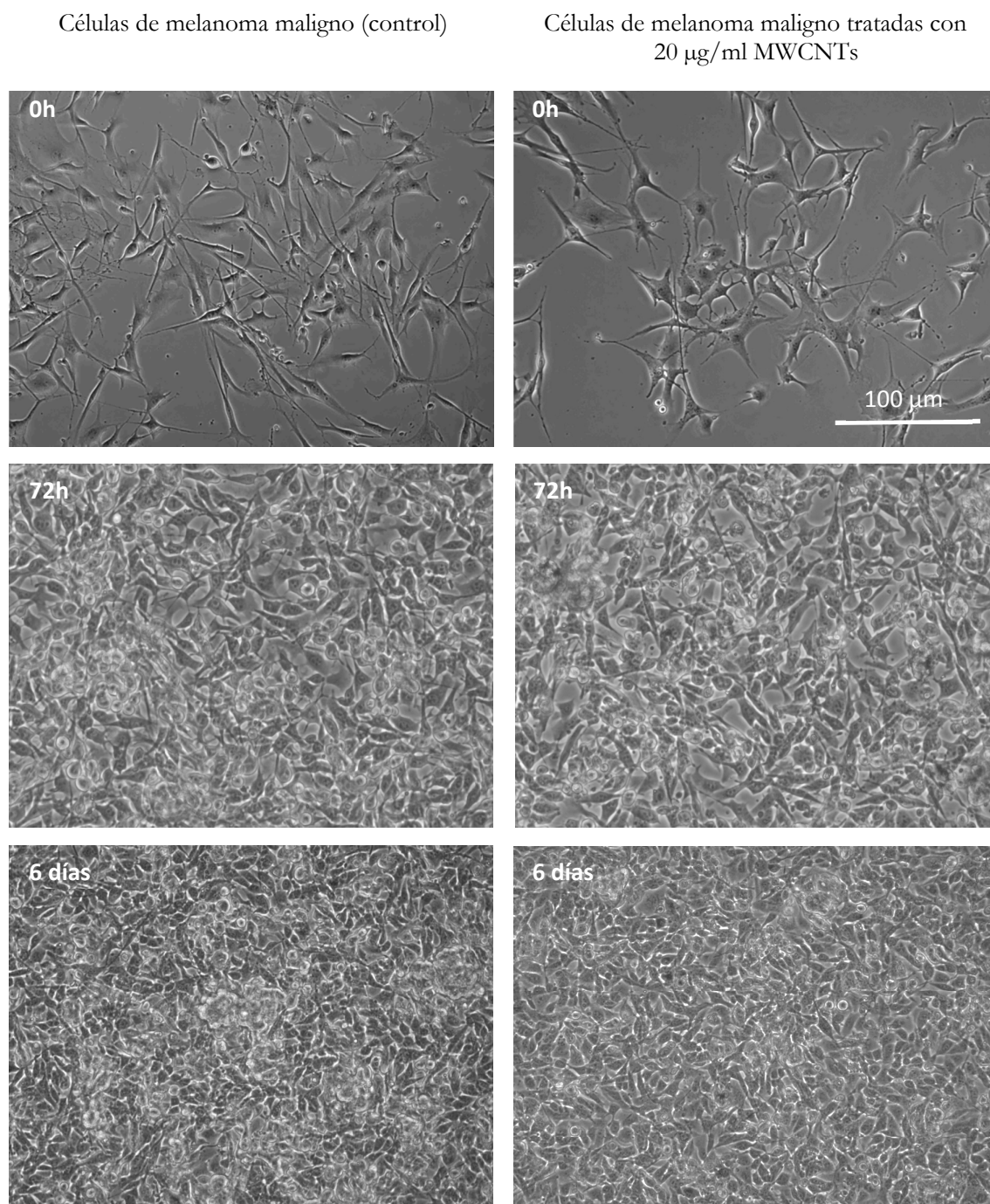


Figura 50. Imágenes de contraste de fases de células de melanoma maligno control y tratadas con 20 $\mu\text{g/mL}$ MWCNTs. En la columna de la izquierda se aprecian imágenes de un cultivo de células control (sin tratar) durante diferentes tiempos y en la columna de la derecha los cultivos de células tratadas con 20 $\mu\text{g/mL}$ de MWCNTs. Queda de manifiesto que a esta dosis no se produce aparente daño citotóxico, ya que las células muestran el mismo fenotipo que las controles.

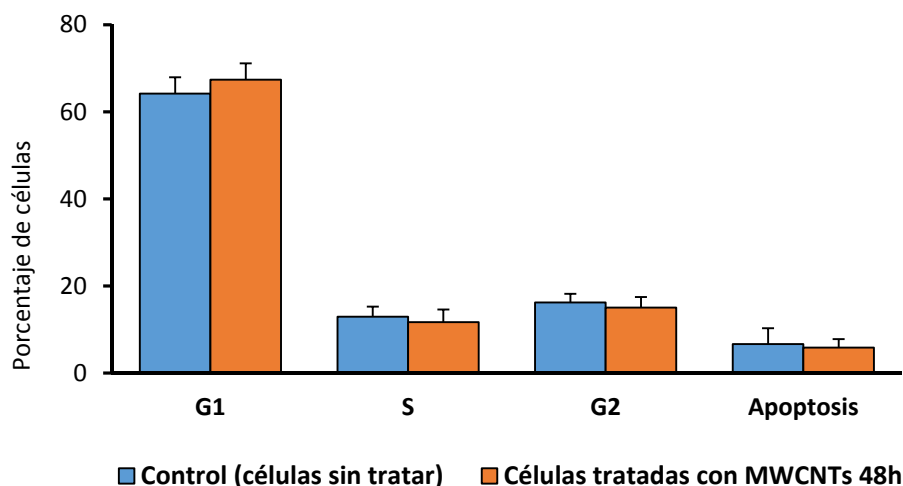


Figura 51. Supervivencia y ciclo celular en células de melanoma maligno sin tratar y tratadas con 20 $\mu\text{g/mL}$ MWCNTs durante 48 horas. Comparando los datos obtenidos mediante citometría de flujo de las células sin tratar (azul) con respecto a las tratadas (naranja) se observa que apenas existen diferencias en ninguna de las fases del ciclo, por lo queda demostrado que esta dosis no produce alteraciones detectables en el ciclo de división celular.

También observamos por microscopía electrónica de transmisión que secciones de células tumorales de melanoma maligno mostraban material carbonoso en su interior (figura 52) corroborando así que ese tiempo (48h) es suficiente para que los MWCNTs entren en la célula.

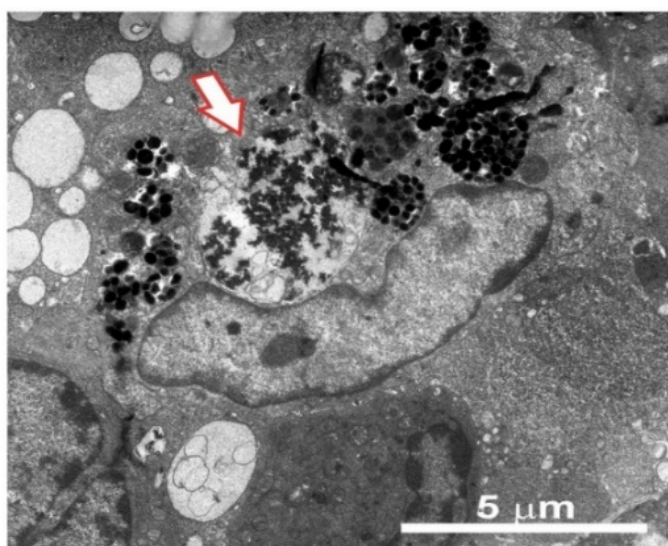


Figura 52. Imagen de microscopía electrónica de transmisión de una célula de melanoma con MWCNTs. Se aprecian abundantes melanóforos y un gran fagosoma que contiene depósitos de materiales carbonosos (flecha).

Efecto antitumoral de los MWCNTs

Estudiados todos estos parámetros procedimos con el primero de los enfoques. Este estudio tiene como objetivo reducir al máximo la variabilidad natural y el ruido inherente del sistema *in vivo*. Consiste en un enfoque de tipo “caballo de Troya” donde se incubaron células de melanoma maligno con MWCNTs y fueron después trasplantadas al ratón para generar tumores sólidos. En paralelo se trasplantaron células sin tratar que se emplearon como controles (figura 53).

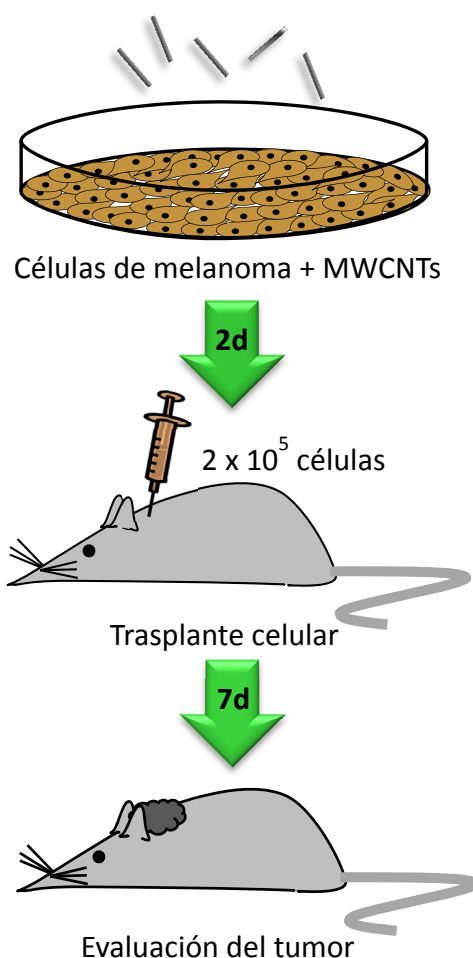


Figura 53. Esquema del tratamiento tumoral con MWCNTs dentro de las células malignas. Las células se incubaron con 20 µg/mL de MWCNTs en el medio de cultivo durante 48 horas. Pasado ese tiempo se trasplantaron 2 x 10⁵ células subcutáneamente en el ratón. 7 días después del trasplante celular, el tumor se ha desarrollado correctamente por lo que se procede a su evaluación. Para cada experimento tanto los ratones control (con células de melanoma sin tratar con MWCNTs) como los que tienen MWCNTs pertenecen siempre a la misma camada.

Tras siete días de crecimiento, sacrificio y disección de los tumores, éstos se pesaron para su evaluación. La cuantificación del peso tumoral tras el tratamiento reveló que los tumores tratados con MWCNTs eran un 60% más pequeños. El análisis histopatológico demuestra que los tumores generados a partir de células de melanoma tratadas con MWCNTs tienen un patrón sólido pseudo-papilar y una acantolisis visible (figura 54).

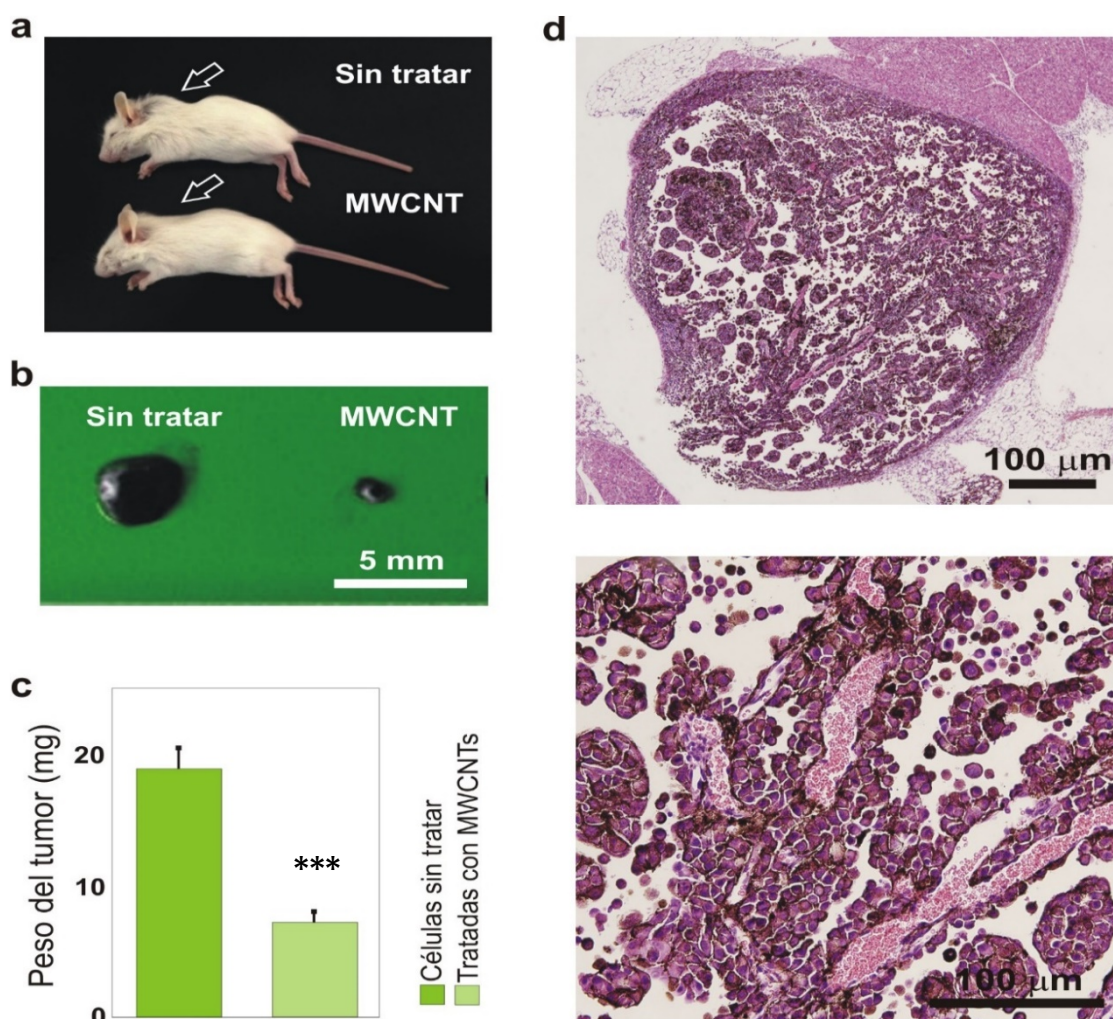


Figura 54. Resultados obtenidos con el modelo “caballo de Troya”. a) Ratones representativos de la misma camada usados para el experimento. Las células de melanoma maligno tratadas con MWCNTs producen tumores más pequeños (flechas) que las células no tratadas. b) Ejemplo de masas tumorales de melanomas sólidos. c) Análisis estadístico del efecto antineoplásico de los MWCNTs intracelulares. El peso medio del tumor fue significativamente menor cuando las células de melanoma maligno fueron tratadas con MWCNTs ($t = 5,38$; $n = 77$; nivel de confianza $> 99,9\%$). Los cortes de hematoxilina-eosina del tumor presentan una masa tumoral de células no infiltrante del epitelio pigmentado, células de melanoma típicamente empaquetadas en pequeñas masas bien definidas, que presenta un patrón pseudo-papilar sólido y acantolisis (pérdida de conexiones intercelular) alrededor de los vasos sanguíneos. Abajo se observa la acantolisis que rodea los vasos sanguíneos pequeños cargados de eritrocitos visibles.

A pesar de los buenos resultados obtenidos, existen pros y contras en este enfoque que debemos tener en cuenta de forma objetiva. Por un lado, este método evita el problema de la posible interferencia con el microambiente del tumor garantizando al mismo tiempo que la mayoría de las células cancerosas malignas de la masa tumoral son portadoras de MWCNTs. Por otra parte, y a pesar de que no se ha observado diferencias significativas en la supervivencia celular *in vitro*, a estas dosis no hay forma de garantizar que todas las células tratadas con MWCNTs sean totalmente viables horas después del trasplante. Por lo tanto, con el fin de obtener una visión más cercana de la situación real, se realizó un segundo enfoque más “realista”.

4.8.2 Tratamiento intratumoral con MWCNTs

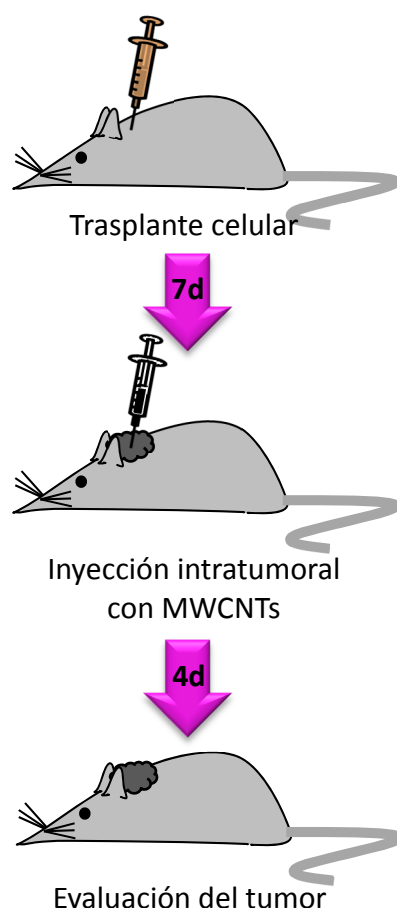


Figura 55. Esquema del tratamiento intratumoral. Se trasplantan 2×10^5 células subcutáneamente en el ratón post-natal 4. Pasados 7 días, donde el tumor se ha desarrollado correctamente y ya es totalmente visible en ratones albinos se procede a una inyección intratumoral con medio (control) en la mitad de la camada, y con MWCNTs en la otra mitad de la camada. Se evalúan los tumores 4 días después de un único tratamiento.

Este enfoque consiste en una inyección única de MWCNTs directamente en los tumores de melanoma (Figura 55). Este método, aunque mucho más susceptible a artefactos biológicos, proporciona una evidencia directa del efecto anti-tumoral intrínseco de los MWCNTs *in vivo*. Para el estudio, generamos tumores de melanoma sólidos que se dejaron crecer durante 7 días antes de la inyección intratumoral, esta se llevó a cabo, bien con MWCNTs (tratados) o sólo con medio de cultivo (controles).

Efecto antitumoral de los MWCNTs

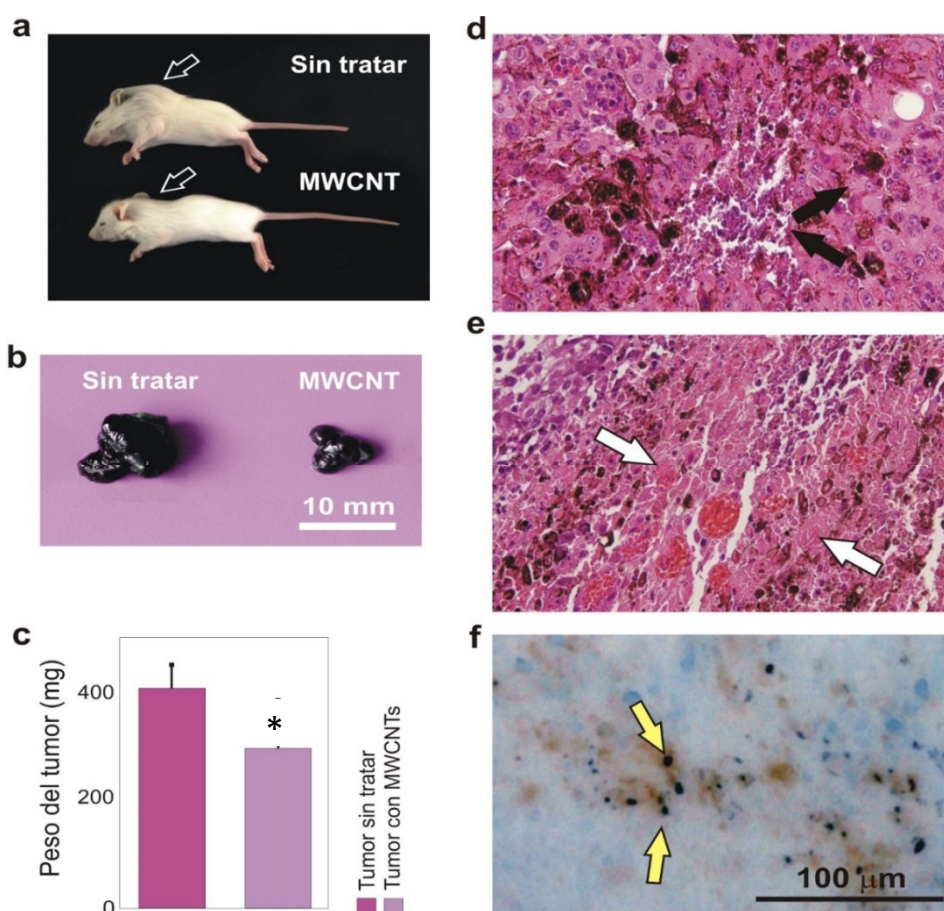


Figura 56. Resultados obtenidos con el tratamiento intratumoral de MWCNTs. a) Foto de dos ratones hermanos de camada representativos utilizados para el experimento, donde los ratones inyectados con MWCNTs tienen tumores más pequeños que los tumores control (flechas). b) Masas tumorales de melanomas sólidos. c) Análisis estadístico del efecto de una sola inyección de MWCNTs. El tamaño tumoral medio fue significativamente menor en los tumores tratados con MWCNTs ($t = 1,85$; $n = 161$; de nivel de confianza = 98%). d) Análisis histopatológico de tumores tratados con MWCNTs, secciones teñidas con hematoxilina-eosina. Las masas tumorales muestran una intensa inflamación peritumoral, multifocos de necrosis que muestran depósitos negros de carbono que a menudo se entremezcla con la melanina en las células pigmentadas. e) Detalle de células epiteliales pigmentadas de color marrón entremezcladas con áreas de necrosis por coagulación y células que muestran cariólisis en el tumor (blanco flechas). f) Aumento de los depósitos de carbono negro intratumoral (flechas amarillas).

La cuantificación y evaluación de los tumores la llevamos a cabo 4 días después del tratamiento. En una población total de más de 200 ratones los resultados obtenidos revelaron que una única inyección intratumoral de 2 μg de MWCNTs produce efectos antitumorales notables, dando lugar a masas tumorales un 27% más pequeñas que las observadas en los controles no tratados (figura 56).

4.9 LOS MWCNTs MUESTRAN EFECTOS ANTINEOPLÁSICOS SINÉRGICOS AL TAXOL®

Como ya hemos descrito en la introducción de esta tesis doctoral el modelo de interacción estructural de los nanotubos de carbono con los microtúbulos tiene lugar a lo largo de todo el protofilamento de tubulina, interfiriendo con la dinámica de los microtúbulos. También hemos descrito previamente cómo la acción de los fármacos tradicionales por su unión a la β -tubulina interfieren con la dinámica microtubular. A la interacción de los MWCNTs con los microtúbulos, en este modelo parece compatible y complementario la acción de los fármacos tradicionales. En este contexto, pareció muy interesante completar los estudios poniendo de manifiesto los efectos anti-tumorales de los MWCNTs en tumores resistentes a taxol®.

4.9.1 Resistencia al taxol® de las células de melanoma maligno

Lo primero que hicimos fue evaluar la resistencia a taxol® de las células de melanoma maligno *in vitro*. Comparándolo con cultivos de células Hela, utilizadas como línea típica de cultivo celular, observamos que las células de melanoma maligno eran mucho más resistentes, es decir, que se necesita mayor dosis de este fármaco para un efecto citotóxico (figura 57). Los cultivos de células de melanoma maligno tratados con 40 μM de taxol® sobrevivían más de 6 días. Sin embargo, en células HeLa, con esa concentración, en 24 horas todas las células estaban muertas (figura 57).

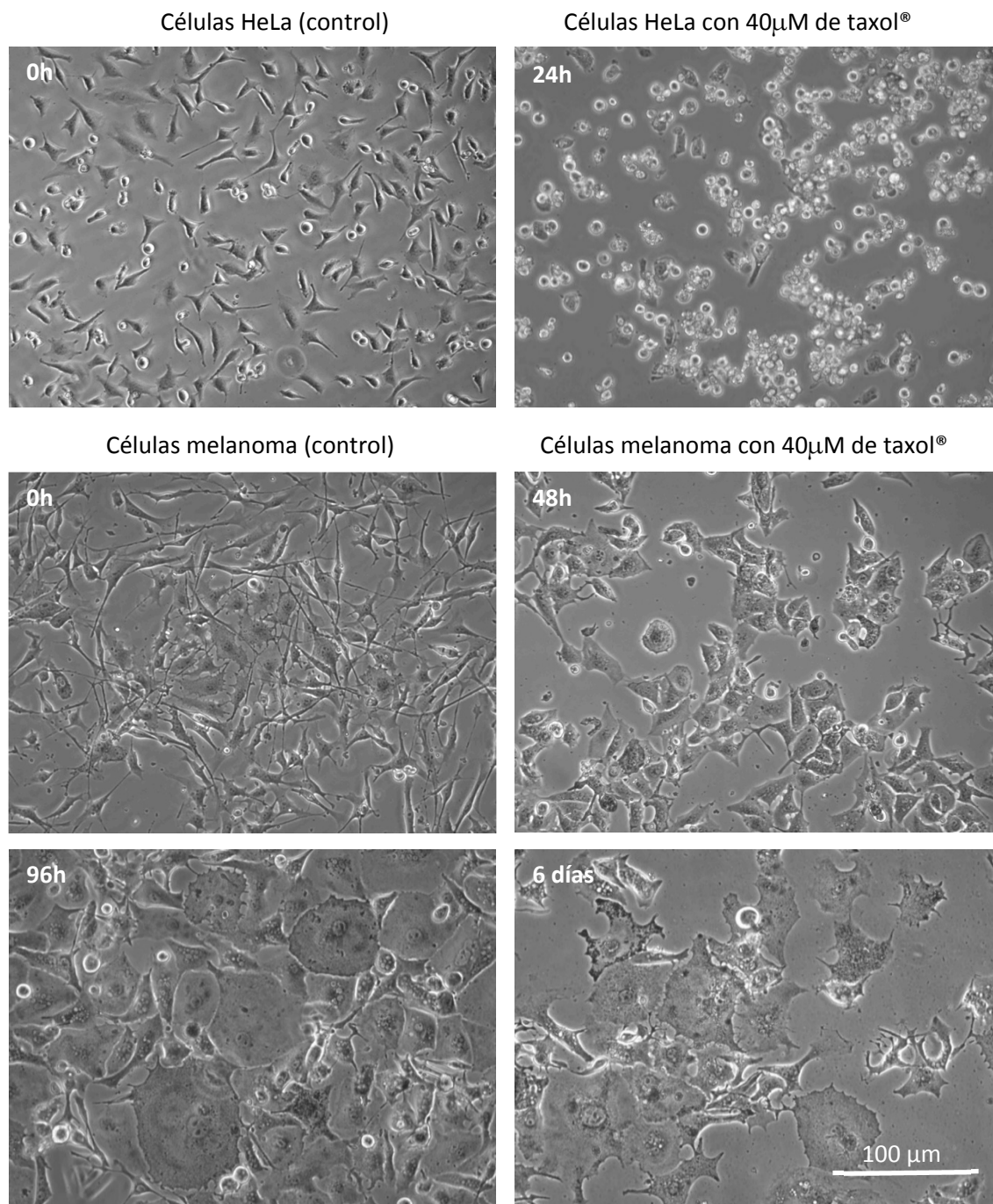


Figura 57. Imágenes de contraste de fases de células Hela y de melanoma tratadas con 40 μ M de taxol® durante diferentes tiempos. Arriba: células Hela tratadas con 40 μ M de taxol® durante 24 horas, tiempo suficiente para que todas las células mueran. Abajo: células de melanoma tratadas con 40 μ M de taxol® durante 6 días. En este tiempo, aunque se observa un cambio morfológico notable en el cultivo celular, no todas las células han muerto.

4.9.2 Efecto sinérgico de los MWCNTs a la acción del taxol®

En los cultivos de células de melanoma maligno tratados con esa dosis de taxol® (40 μ M) existen pequeñas colonias celulares capaces de sobrevivir porque han desarrollado fenómenos de resistencia. Aproximadamente 4 semanas después del tratamiento con taxol® crecen pequeñas colonias de células resistentes a la acción de este fármaco. Estas células se crecieron y se trasplantaron en los ratones para generar tumores sólidos siguiendo el protocolo anterior.

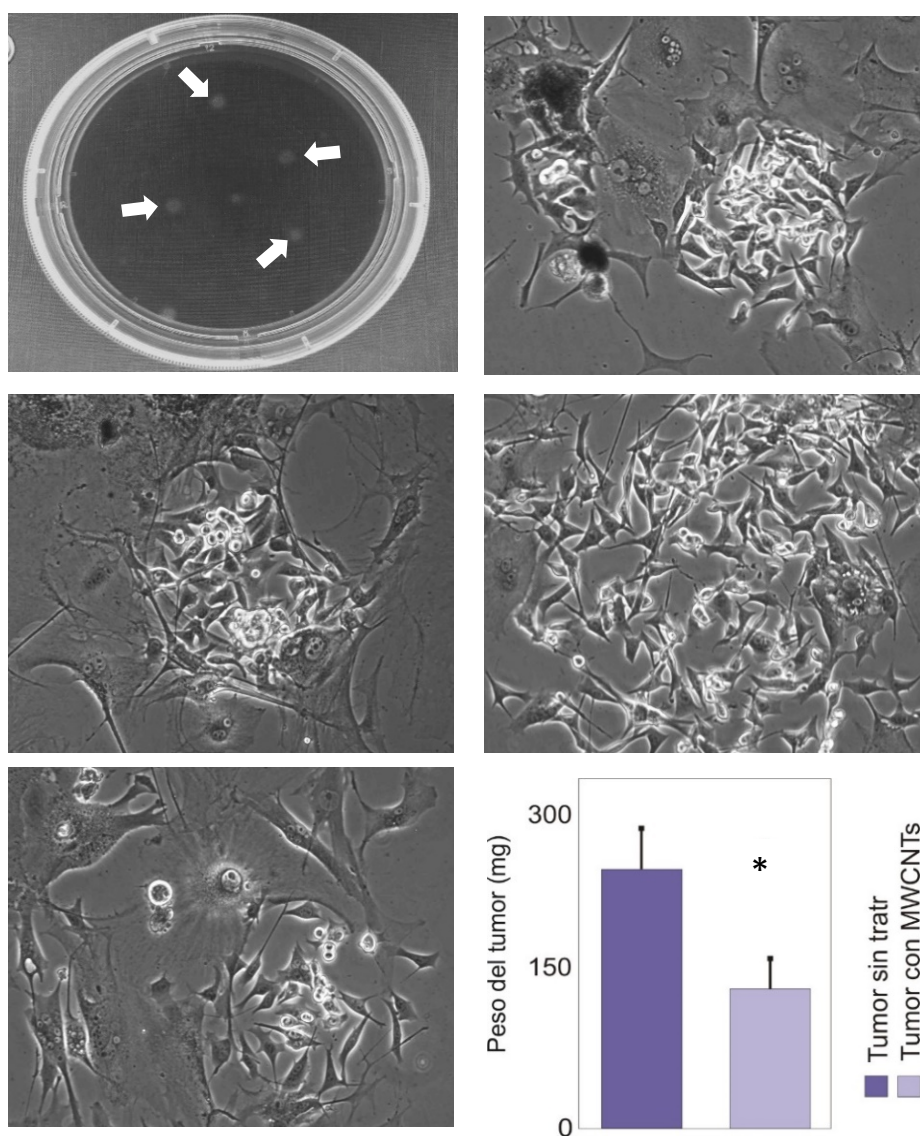


Figura 58. Efecto adyuvante de los MWCNTs a taxol® en células resistentes *in vivo*. Arriba izquierda: Las colonias de células de melanoma resistentes a taxol® visibles cuatro semanas después del tratamiento con este fármaco. Arriba derecha, medio y abajo izquierda: Imágenes de contraste de fase de colonias de células resistentes a taxol® antes de la amplificación celular. Abajo derecha: Análisis estadístico del efecto de inyecciones individuales de MWCNTs en los tumores generados con células de melanoma resistentes a taxol® ($t = 1,81$; $n = 74$; nivel de confianza = 95%).

Los resultados para más de 100 ratones muestran que los tumores de melanoma resistentes a taxol® llegaban a ser un 45% más pequeños después de un único tratamiento de 2µg de MWCNTs (figura 58). Estos resultados sugieren un efecto adyuvante significativo de los MWCNTs en los tumores resistentes a taxol®.

En resumen, hemos demostrado cómo los MWCNTs tienen propiedades antineoplásicas intrínsecas, provocando efectos anti-proliferativos y citotóxicos en neoplasias altamente agresivas y heterogéneas como melanomas malignos, muy difíciles de tratar con quimioterapias convencionales como el taxol®. Estos resultados sirven para conjeturar que los MWCNTs pueden representar un nuevo tipo de agente estabilizador de microtúbulos que podrían ser utilizados como tratamientos adyuvantes o neoadyuvantes para mejorar el efecto de la quimioterapia tradicional estabilizadora de los microtúbulos y así prevenir la resistencia a los fármacos en células del cáncer.

V. DISCUSIÓN



Actualmente el cáncer es una de las enfermedades con mayor índice de mortalidad y por tanto un gran problema al que se enfrenta el mundo desarrollado. En las cuatro últimas décadas se ha investigado mucho acerca de la biología del cáncer, gracias a lo cual se ha llegado a conocer gran parte de los factores que favorecen su desarrollo y los mecanismos moleculares que dan lugar a la transformación en células cancerígenas. Sin embargo, no existe un tratamiento 100% eficaz contra el cáncer. Las células de cáncer experimentan continuamente adaptaciones genéticas para escapar del control de estos medicamentos, por lo que la resistencia es uno de los problemas más difíciles de solucionar. Debido a ello surge la importancia de buscar alternativas a los tratamientos tradicionales contra el cáncer, apareciendo así nuevas disciplinas.

La Nanomedicina se ha postulado como una ciencia firme en este campo, ya que tiene como objetivo el uso de nanotecnología para diagnosticar, prevenir y tratar enfermedades. Esta disciplina está revolucionando el mundo de la medicina hasta el punto de considerarse en algunos ámbitos como la medicina del futuro, ya que puede proporcionar maneras radicalmente diferentes de tratar las enfermedades. Los nanomateriales poseen muchas características que les hacen únicos. La principal es su escala de tamaño, similar a la de biomoléculas o estructuras celulares, como anticuerpos, ácidos nucleicos u otra clase de filamentos celulares (microtúbulos, filamentos de actina, etc) con los que pueden interaccionar en el interior celular. Su tamaño nanométrico les confieren propiedades físico-químicas y biológicas únicas, haciendo que tengan aplicaciones muy variadas. Una de las ventajas más significativas es su elevada relación superficie/volumen, lo que les dota de una gran capacidad para poder unirles moléculas a su superficie (fármacos, isótopos, proteínas, ácidos nucleicos, etc) y hacerlo además con una gran dosis, por lo que puede causar un mayor efecto. Además, su pequeño tamaño evita, en algunos casos, los problemas de solubilidad (Kharb *et al*, 2006) que tienen algunos medicamentos anticancerosos tradicionales, los cuales, al tener una baja solubilidad deben de ir acompañados de disolventes que, no sólo disminuyen la potencia de los medicamentos, sino además producen efectos tóxicos (Di & Kerns, 2010).

Los hallazgos de esta tesis ponen de manifiesto los efectos antineoplásicos intrínsecos de los MWCNTs tanto *in vitro* como *in vivo*, que junto con su fácil internalización en las células, su gran superficie y su interior hueco les transforma en plataformas biotecnológicas muy atractivas donde anclar ligandos, fármacos u otras moléculas que les hicieran capaces de dirigirse a células específicas y ejercer allí su acción.

Pese a ello, los nanotubos de carbono todavía poseen una serie de inconvenientes para su uso en medicina. Uno de los más importantes es su variabilidad en términos de longitud, diámetro, número de paredes, quiralidad, grado de funcionalización, así como la existencia de impurezas residuales. Estos niveles de variabilidad pueden ser minimizados (Sanchez-Valencia *et al*, 2014), pero no eliminados, lo cual dificulta su aprobación como tratamientos. Además, pese a los numerosos estudios enfocados a implementar su entrada en las células, los mecanismos de captación celular todavía son objeto de debate (Kam & Dai, 2005; Lacerda *et al*, 2013). En cuanto a la toxicidad de estos nanomateriales, a menudo los datos son contradictorios, ya que se utilizan diversos tipos de nanotubos, diferentes métodos de evaluación, e incluso distintas formas de exposición. Los estudios más recientes indican que el acortamiento de los nanotubos podría mejorar las características toxicológicas de los nanotubos funcionalizados que se han utilizado en los estudios *in vivo* (Kostarelos, 2008), aunque ha de tenerse en cuenta la variabilidad de cada lote (Kostarelos *et al*, 2009). Además, existe numerosa bibliografía acerca del uso de nanotubos en biomedicina, pero en casi todos los casos estos nanomateriales proporcionan una mejora frente a una tecnología ya existente. Por ejemplo, el hecho de que los nanotubos produzcan calor cuando se irradia con luz de infrarrojo cercano significa que podrían ser utilizados en la destrucción selectiva de las células cancerosas, sin embargo, las nanocápsulas de oro tienen el mismo comportamiento y son más fáciles de purificar, caracterizar y manipular. Del mismo modo, existen datos de la degradación de nanotubos funcionalizados tanto *in vitro* como *in vivo* (Bianco *et al*, 2011), sin embargo, a día de hoy, esta degradación puede ser demasiado lenta y existe al riesgo de la acumulación en los tejidos.

Todos estos inconvenientes, que hacen difícil de justificar el uso de nanotubos en clínica, pueden ser compensados por las novedosas propiedades de los nanotubos de carbono, en las que se están centrando las líneas de investigación más actuales. Los nanotubos de carbono son nanofibras huecas, lo que les hace atractivos candidatos para la entrada de agentes terapéuticos o de diagnóstico, ya que esta encapsulación es una gran estrategia para el control de su biodistribución. En este sentido, existen dos importantes ventajas de los nanotubos de carbono con respecto a otros métodos de encapsulación como micelas, mesoporos de sílice, etc. Por una parte, la cavidad es continua, vacía y representa la mayor parte del nanotubo, lo cual significa que puede incluir desde metales elementales (Ajayan & lijima, 1993), sales iónicas (Sloan *et al*, 2002), moléculas (Su *et al*, 2011), o nanoestructuras (Ren & Pastorin, 2008), todo ello con un alto rendimiento. Otra ventaja es la capacidad de cerrar el extremo del nanotubo y permitir el sellado de los materiales que se encuentran en su interior. En este ámbito, los primeros estudios llevados a cabo utilizaron nanoestructuras como "tapones" para prevenir la fuga del material encapsulado (Ren & Pastorin, 2008). Estudios más recientes mejoran el sistema mediante el sellado con nanopartículas de ferrita magnética, las cuales permite un “atasco” en el interior del nanotubo, evitando el escape de las moléculas encapsuladas (Liu *et al*, 2014).

La capacidad de portar moléculas u otros nanomateriales en su interior unida a la posibilidad de sellado del nanotubo les dota de un enorme potencial para su uso en terapia y el diagnóstico, por lo que el siguiente paso debería de ir encaminado en implementar su direccionamiento hacia células o tumores malignos, mediante la unión de moléculas a su superficie que actúen de ligando específico y reconocimiento diana por parte de las células cancerígenas. La mayoría de los estudios en este campo direccionan los nanotubos mediante la funcionalización con anticuerpos, ácidos grasos, polisacáridos, péptidos y vitaminas. Existen trabajos actuales que engloban estas tres características, tanto para la terapia como el diagnóstico. Uno de ellos muestra la posibilidad de introducir isótopos radiactivos, por ejemplo de Na^{125}I , en el interior del nanotubo de carbono, a los que se les une covalentemente moléculas de reconocimiento celular, como N-acetil-glucosamida. Estas “cápsulas” resultantes administradas en ratones muestran una distribución pulmonar y permiten reducir al

mínimo la radiación utilizada para una correcta imagen, mejorando las realizadas hasta entonces, debido a la intensa concentración de yoduro dentro de los nanotubos y su retención estable (Serpell *et al*, 2016). Otro ejemplo muestra cómo nanotubos de carbono rellenos de hierro son funcionalizados con un anticuerpo contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, del inglés *epidermal growth factor receptor*) que se sobre-expresa en células de cáncer. Así, se podría inducir hipertermia mediante radiación electromagnética lo que daría como resultado sólo la muerte de las células que han expresado EGFR (Marega *et al*, 2013).

Los ejemplos mencionados son representativos de las enormes capacidades de los nanotubos de carbono. Así, siendo conocedores de este potencial y siguiendo nuestra línea de investigación, cobraría gran importancia el hecho de incluir fármacos sinérgicos a la acción antineoplásica de estos MWCNTs demostrada en esta tesis doctoral, como por ejemplo los compuestos inhibidores de la dinámica microtubular o compuestos inhibidores de la glicólisis. Estos últimos potenciarían el efecto antiproliferativo y citotóxico de los nanotubos, inhibiendo al sistema de producción energético característico de las células del cáncer (efecto Warburg) (Pelicano *et al*, 2006), mecanismo que permite a éstas células obtener su energía preferentemente de la ruta glucolítica y crítico durante la mitosis. Estudios recientes demuestran cómo el tratamiento con fármacos inhibidores de la glicólisis aumentan el efecto citotóxico del taxol®, y por ende de los MWCNTs, hasta en un 100% en células arrestadas mitóticamente (Doménech *et al*, 2015).

Aunque todavía hay un largo camino por recorrer, el direccionamiento, la capacidad de encapsular fármacos, moléculas o nanomateriales en su interior, unido a sus efectos antineoplásicos intrínsecos, hace de los nanotubos de carbono unos candidatos muy interesantes para su uso en biomedicina y más concretamente en el campo de las terapias antineoplásicas.



VI. CONCLUSIONES



- 1- Los MWCNTs se pueden dispersar en suero humano.
- 2- La dispersión de MWCNTs en sueros humanos varía en estrecha relación con la composición de cada suero. La albúmina humana purificada es un sistema reproducible para la resuspensión de MWCNTs.
- 3- Los MWCNTs causan efectos citotóxicos *in vitro* en células procedentes de cánceres malignos humanos de diferentes orígenes interfiriendo con la dinámica de los microtúbulos, fundamentalmente en mitosis.
- 4- Los MWCNTs producen cambios biomecánicos en el eje núcleo-centrosomal desencadenando efectos anti-migratorios *in vitro*.
- 5- Los MWCNTs muestran un efecto antiproliferativo en células de melanoma maligno murino *in vitro*, aumentando el tiempo medio de la división celular.
- 6- El modelo tumoral de melanoma maligno desarrollado por alotrasplante en ratones neonatos es fácilmente identificable, cuantificable y reproducible, haciendo que sea un excelente ejemplo de órgano tumoral para el estudio de los efectos antineoplásicos de los MWCNTs *in vivo*.
- 7- Los MWCNTs tienen efectos antineoplásicos intrínsecos en tumores sólidos de melanomas *in vivo*.
- 8- Los MWCNTs tienen efecto sinérgico al taxol® en melanomas sólidos producidos por células resistentes al taxol® en modelos *in vivo* en ratones.

VII. BIBLIOGRAFÍA



- Ahn S-H, Henderson Y, Kang Y, Chattopadhyay C, Holton P, Wang M, Briggs K & Clayman GL (2008) An orthotopic model of papillary thyroid carcinoma in athymic nude mice. *Arch. Otolaryngol. Head. Neck Surg.* **134**: 190–197
- Akhmanova A & Steinmetz MO (2008) Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**: 309–22
- Alberti C (2009) Cytoskeleton structure and dynamic behaviour: quick excursus from basic molecular mechanisms to some implications in cancer chemotherapy. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **13**: 13–21
- Alberti C (2013) Taxane- and epothilone-based chemotherapy: from molecule cargo cytoskeletal logistics to management of castration-resistant prostate carcinoma. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **17**: 1658–64
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K & Walter P (2002) Molecular Biology of the Cell. ISBN-10: 0-8153-3218-1
- Amos L a & Baker TS (1979) The three-dimensional structure of tubulin protofilaments. *Nature* **279**: 607–612
- Bae KH, Chung HJ & Park TG (2011) Nanomaterials for cancer therapy and imaging. *Mol. Cells* **31**: 295–302
- Balch CM, Gershenwald JE, Soong S-J, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, Buzaid AC, Cochran AJ, Coit DG, Ding S, Eggermont AM, Flaherty KT, Gimotty PA, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MC, Morton DL, Ross MI, Sober AJ & Sondak VK (2009) AJCC melanoma staging and classification. *J. Clin. Oncol.* **27**: 6199–206
- Barnett GC, West CML, Dunning AM, Elliott RM, Coles CE, Pharoah PDP & Burnet NG (2009) Normal tissue reactions to radiotherapy: towards tailoring treatment dose by genotype. *Nat. Rev. Cancer* **9**: 134–42
- Bédier A, Seichepine F, Flahaut E, Loubinoux I, Vaysse L & Vieu C (2012) Elucidation of the role of carbon nanotube patterns on the development of cultured neuronal cells. *Langmuir* **28**: 17363–71
- Belmont LD & Mitchison TJ (1996) Identification of a protein that interacts with tubulin dimers and increases the catastrophe rate of microtubules. *Cell* **84**: 623–31
- Bernier J, Hall EJ & Giaccia A (2004) Radiation oncology: a century of achievements. *Nat. Rev. Cancer* **4**: 737–47
- Bhalla KN (2003) Microtubule-targeted anticancer agents and apoptosis. *Oncogene* **22**: 9075–86
- Bhatia SK & Myers AL (2006) Optimum conditions for adsorptive storage. *Langmuir* **22**: 1688–700
- Bianco A, Kostarelos K & Prato M (2011) Making carbon nanotubes biocompatible and biodegradable. *Chem. Commun. (Camb)*. **47**: 10182–8
- Blackburn EH (1991) Structure and function of telomeres. *Nature* **350**: 569–573
- Blasco MA (2005) Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat. Rev. Genet.* **6**: 611–22
- Bokobza L (2007) Multiwall carbon nanotube elastomeric composites: A review. *Polymer (Guildf)*. **48**: 4907–4920
- Boulaiz H, Alvarez PJ, Ramirez A, Marchal JA, Prados J, Rodríguez-Serrano F, Perán M, Melguizo C & Aranega A (2011) Nanomedicine: application areas and development prospects. *Int. J. Mol. Sci.* **12**: 3303–21
- Bourzac K (2012) Nanotechnology: Carrying drugs. *Nature* **491**: S58–60
- De Brabander M, Geuens G, Nuydens R, Willebrords R & De Mey J (1981) Taxol induces the

- assembly of free microtubules in living cells and blocks the organizing capacity of the centrosomes and kinetochores. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **78**: 5608–612
- Bradshaw DM & Arceci RJ (1998) Clinical relevance of transmembrane drug efflux as a mechanism of multidrug resistance. *J. Clin. Oncol.* **16**: 3674–90
- Brizel DM, Dodge RK, Clough RW & Dewhirst MW (1999) Oxygenation of head and neck cancer: changes during radiotherapy and impact on treatment outcome. *Radiother. Oncol.* **53**: 113–7
- Carlier MF & Pantaloni D (1981) Kinetic analysis of guanosine 5'-triphosphate hydrolysis associated with tubulin polymerization. *Biochemistry* **20**: 1918–1924
- Cassimeris L, Pryer NK & Salmon ED (1988) Real-time observations of microtubule dynamic instability in living cells. *J. Cell Biol.* **107**: 2223–31
- Chabner BA & Roberts TG (2005) Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. *Nat. Rev. Cancer* **5**: 65–72
- Chen J, Liu T, Dong X & Hu Y (2009) Recent development and SAR analysis of colchicine binding site inhibitors. *Mini Rev. Med. Chem.* **9**: 1174–90
- Chiche J, Brahimi-Horn MC & Pouyssegur J (2010) Tumour hypoxia induces a metabolic shift causing acidosis: a common feature in cancer. *J. Cell. Mol. Med.* **14**: 771–94
- Colditz GA, Sellers TA & Trapido E (2006) Epidemiology - identifying the causes and preventability of cancer? *Nat. Rev. Cancer* **6**: 75–83
- Dawson, Taylor & Raide (2001) Lo esencial en Farmacología. *Harcourt*. ISBN: 9788481746945
- Desai A & Mitchison TJ (1997) Microtubule polymerization dynamics. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **13**: 83–117
- Di L & Kerns EH (2010) Drug-like properties: concepts, structure design and methods: from ADME to toxicity optimization. ISBN :9780080557618
- Dinu CZ, Bale SS, Zhu G & Dordick JS (2009) Tubulin encapsulation of carbon nanotubes into functional hybrid assemblies. *Small* **5**: 310–5
- Dobson J (2012) Cancer therapy: Death by magnetism. *Nat. Mater.* **11**: 1006–8
- Dohle DS, Pasa SD, Gustmann S, Laub M, Wissler JH, Jennissen HP & Dünker N (2009) Chick *ex ovo* culture and *ex ovo* CAM assay: how it really works. *J. Vis. Exp.*
- Doménech E, Maestre C, Esteban-Martínez L, Partida D, Pascual R, Fernández-Miranda G, Seco E, Campos-Olivas R, Pérez M, Megias D, Allen K, López M, Saha AK, Velasco G, Rial E, Méndez R, Boya P, Salazar-Roa M & Malumbres M (2015) AMPK and PFKFB3 mediate glycolysis and survival in response to mitophagy during mitotic arrest. *Nat. Cell Biol.* **17**: 1304–16
- Downing KH (2000) Structural basis for the interaction of tubulin with proteins and drugs that affect microtubule dynamics. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**: 89–111
- Dumontet C & Jordan MA (2010) Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* **9**: 790–803
- Evans L, Mitchison T & Kirschner M (1985) Influence of the centrosome on the structure of nucleated microtubules. *J. Cell Biol.* **100**: 1185–91
- Farokhzad OC, Cheng J, Teply BA, Sherifi I, Jon S, Kantoff PW, Richie JP & Langer R (2006) Targeted nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**: 6315–20
- Fesik SW (2005) Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. *Nat. Rev. Cancer* **5**: 876–85
- Flahaut E, Laurent C & Peigney a. (2005) Catalytic CVD synthesis of double and triple-walled carbon nanotubes by the control of the catalyst preparation. *Carbon N. Y.* **43**: 375–383

- Gabizon A, Bradbury M, Prabhakar U, Zamboni W, Libutti S & Grodzinski P (2014) Cancer nanomedicines: closing the translational gap. *Lancet (London, England)* **384**: 2175–6
- García-Hevia L, Fernández F, Casafont I, Villegas JC & Fanarraga ML (2016a) A fast, reliable and cost-effective method to generate tumor organs for therapy screening *in vivo*. *Biomed. Phys. Eng. Express* **2**: 035009. DOI:10.1088/2057-1976/2/3/035009
- García-Hevia L, Fernández F, García A, Grávalos C, Villegas JC & Fanarraga ML (2014) Nanotube interactions with microtubules : implications for cancer medicine. *Nanomedicine* **9**: 1581–1588
- García-Hevia L, Valiente R, Fernández-Luna JL, Flahaut E, Rodríguez-Fernández L, Villegas JC, González J & Fanarraga ML (2015a) Inhibition of Cancer Cell Migration by Multiwalled Carbon Nanotubes. *Adv. Healthc. Mater.* **4**: 1640–1644
- García-Hevia L, Valiente R, González J, Fernández-Luna JL, Villegas JC & Fanarraga ML (2015b) Anti-Cancer Cytotoxic Effects of Multiwalled Carbon Nanotubes. *Curr. Pharm. Des.* **21**: 1920–29
- García-Hevia L, Villegas JC, Fernández F, Casafont Í, González J, Valiente R & Fanarraga ML (2016b) Multiwalled Carbon Nanotubes Inhibit Tumor Progression in a Mouse Model. *Adv. Healthc. Mater.*
- Geim AK & Novoselov KS (2007) The rise of graphene. *Nat. Mater.* **6**: 183–91
- Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, Martinez P, Matthews N, Stewart A, Tarpey P, Varela I, Phillimore B, Begum S, McDonald NQ, Butler A, Jones D, Raine K, Latimer C, Santos CR, Nohadani M, et al (2012) Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N. Engl. J. Med.* **366**: 883–92
- Gerth K, Bedorf N, Höfle G, Irschik H & Reichenbach H (1996) Epothilons A and B: antifungal and cytotoxic compounds from *Sorangium cellulosum* (Myxobacteria). Production, physico-chemical and biological properties. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **49**: 560–3
- Giannakakou P, Sackett DL, Kang YK, Zhan Z, Buters JT, Fojo T & Poruchynsky MS (1997) Paclitaxel-resistant human ovarian cancer cells have mutant beta-tubulins that exhibit impaired paclitaxel-driven polymerization. *J. Biol. Chem.* **272**: 17118–25
- Gigant B, Wang C, Ravelli RBG, Roussi F, Steinmetz MO, Curmi PA, Sobel A & Knossow M (2005) Structural basis for the regulation of tubulin by vinblastine. *Nature* **435**: 519–22
- Gilmore AP (2005) Anoikis. *Cell Death Differ.* **12**: 1473–7
- Gong K, Yan Y, Zhang M, Su L, Xiong S & Mao L (2005) Electrochemistry and electroanalytical applications of carbon nanotubes: a review. *Anal. Sci.* **21**: 1383–93
- Gottardi R & Douradinha B (2013) Carbon nanotubes as a novel tool for vaccination against infectious diseases and cancer. *J. Nanobiotechnology* **11**: 30
- Gratton SEA, Ropp PA, Pohlhaus PD, Luft JC, Madden VJ, Napier ME & DeSimone JM (2008) The effect of particle design on cellular internalization pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**: 11613–11618
- Gridelli C, Aapro M, Ardizzoni A, Balducci L, De Marinis F, Kelly K, Le Chevalier T, Manegold C, Perrone F, Rosell R, Shepherd F, De Petris L, Di Maio M & Langer C (2005) Treatment of advanced non-small-cell lung cancer in the elderly: results of an international expert panel. *J. Clin. Oncol.* **23**: 3125–37
- Gujam FJA, Edwards J, Mohammed ZMA, Going JJ & McMillan DC (2014) The relationship between the tumour stroma percentage, clinicopathological characteristics and outcome in patients with operable ductal breast cancer. *Br. J. Cancer* **111**: 157–65
- Gundersen GG & Cook TA (1999) Microtubules and signal transduction. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**: 81–94
- Hamada N, Sawada S & Oshiyama A (1992) New one-dimensional conductors: Graphitic

- microtubules. *Phys. Rev. Lett.* **68**: 1579–1581
- Hanahan D & Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* **100**: 57–70
- Hanahan D & Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**: 646–74
- Harris AL & Hochhauser D (2009) Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer Treatment. *Acta Oncol. (Madr)*. **31**(2):205-13
- Hart IR (1979) The selection and characterization of an invasive variant of the B16 melanoma. *Am. J. Pathol.* **97**: 587–600
- Haskins KM, Donoso JA & Himes RH (1981) Spirals and paracrystals induced by Vinca alkaloids: evidence that microtubule-associated proteins act as polycations. *J. Cell Sci.* **47**: 237–47
- He J, Chen B, Flatt AK, Stephenson JJ, Doyle CD & Tour JM (2006) Metal-free silicon-molecule-nanotube testbed and memory device. *Nat. Mater.* **5**: 63–8
- Hölzel M, Bovier A & Tüting T (2013) Plasticity of tumour and immune cells: a source of heterogeneity and a cause for therapy resistance? *Nat. Rev. Cancer* **13**: 365–76
- Hong NT, Koh KH, Lee S, Minh PN, Tam NTT & Khoi PH (2009) Comparison of field-electron emission from different carbon nanotube array structures. *J. Vac. Sci. Technol. B Microelectron. Nanom. Struct.* **27**: 749
- Honnappa S, Gouveia SM, Weisbrich A, Damberger FF, Bhavesh NS, Jawhari H, Grigoriev I, van Rijssel FJA, Buey RM, Lawera A, Jelesarov I, Winkler FK, Wüthrich K, Akhmanova A & Steinmetz MO (2009) An EB1-binding motif acts as a microtubule tip localization signal. *Cell* **138**: 366–76
- Iijima S (1991) Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* **354**: 56–58
- Jang JE, Cha SN, Choi YJ, Kang DJ, Butler TP, Hasko DG, Jung JE, Kim JM & Amaratunga GAJ (2008) Nanoscale memory cell based on a nanoelectromechanical switched capacitor. *Nat. Nanotechnol.* **3**: 26–30
- Janke C & Bulinski JC (2011) Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**: 773–86
- Jia Y, Wei J, Wang K, Cao A, Shu Q, Gui X, Zhu Y, Zhuang D, Zhang G, Ma B, Wang L, Liu W, Wang Z, Luo J & Wu D (2008) Nanotube-Silicon Heterojunction Solar Cells. *Adv. Mater.* **20**: 4594–4598
- Jordan (1998) Microtubules and actin filaments: dynamic targets for cancer chemotherapy. *Curr. Opin. Cell Bio.* **10**: 123–130
- Jordan (2002) Mechanism of action of antitumor drugs that interact with microtubules and tubulin. *Curr. Med. Chem. Anticancer. Agents* **2**: 1–17
- Jordan, Toso RJ, Thrower D & Wilson L (1993) Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by taxol at low concentrations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**: 9552–6
- Jordan A, Hadfield JA, Lawrence NJ & McGown AT (1998) Tubulin as a Target for Anticancer Drugs: Agents Which Interact with the Mitotic Spindle. **18**(4): 259–296
- Jordan MA & Wilson L (2004) Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat. Rev. Cancer* **4**: 253–65
- Kabbashi NA, Atieh MA, Al-Mamun A, Mirghami ME, Alam M & Yahya N (2009) Kinetic adsorption of application of carbon nanotubes for Pb(II) removal from aqueous solution. *J. Environ. Sci.* **21**: 539–544
- Kam NWS & Dai H (2005) Carbon Nanotubes as Intracellular Protein Transporters: Generality and Biological Functionality. *J. Am. Chem. Soc.* **127**: 6021–6026
- Kamaly N, Xiao Z, Valencia PM, Radovic-Moreno AF & Farokhzad OC (2012) Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: design, development and clinical translation. *Chem. Soc. Rev.* **41**: 2971–

- Kamath K, Wilson L, Cabral F & Jordan MA (2005) BetaIII-tubulin induces paclitaxel resistance in association with reduced effects on microtubule dynamic instability. *J. Biol. Chem.* **280**: 12902–7
- Kaplan HS (1970) Radiobiology's contribution to radiotherapy: promise or mirage? Failla Memorial Lecture. *Radiat. Res.* **43**: 460–76
- Kavallaris M (2010) Microtubules and resistance to tubulin-binding agents. *Nat. Rev. Cancer* **10**: 194–204
- Kelland LR (2004) 'Of mice and men': Values and liabilities of the athymic nude mouse model in anticancer drug development. *Eur. J. Cancer* **40**: 827–836
- Kharb V, Bhatia M, Dureja H & Kaushik D (2006) Nanoparticle technology for the delivery of poorly water-soluble drugs. **30**: 82–92
- Ko YK, Geng J, Jang S-G, Yang S-M, Jeong TW, Jin YW, Kim JM & Jung H-T (2009) Enhanced field emission of an electric field assisted single-walled carbon nanotube assembly in colloid interstices. *Carbon N. Y.* **47**: 1555–1560
- Kostarelos K (2008) The long and short of carbon nanotube toxicity. *Nat. Biotechnol.* **26**: 774–6
- Kostarelos K, Bianco A & Prato M (2009) Promises, facts and challenges for carbon nanotubes in imaging and therapeutics. *Nat. Nanotechnol.* **4**: 627–633
- Kraus E, Little M, Kempf T, Hofer-Warbinek R, Ade W & Ponstingl H (1981) Complete amino acid sequence of beta-tubulin from porcine brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **78**: 4156–60
- Kroto HW, Heath JR, O'Brien SC, Curl RF & Smalley RE (1985) C₆₀: Buckminsterfullerene. *Nature* **318**: 162–163
- Kushwaha SKS, Ghoshal S, Rai AK & Singh S (2013) Carbon nanotubes as a novel drug delivery system for anticancer therapy: a review. *Brazilian J. Pharm. Sci.* **49**: 629–643
- Kyriazis AP, Dipersio L, Michael GJ, Pesce AJ & Stinnett JD (1978) Growing in athymic mice growth patterns and metastatic behavior of human tumors growing in. *Cancer Res.* **38**: 3186–3190
- Lacerda L, Ali-Boucetta H, Kraszewski S, Tarek M, Prato M, Ramseyer C, Kostarelos K & Bianco A (2013) How do functionalized carbon nanotubes land on, bind to and pierce through model and plasma membranes. *Nanoscale* **5**: 10242–50
- Lacerda L, Russier J, Pastorin G, Herrero MA, Venturelli E, Dumortier H, Al-Jamal KT, Prato M, Kostarelos K & Bianco A (2012) Translocation mechanisms of chemically functionalised carbon nanotubes across plasma membranes. *Biomaterials* **33**: 3334–3343
- Lai D, Visser-Grieve S & Yang X (2012) Tumour suppressor genes in chemotherapeutic drug response. *Biosci. Rep.* **32**: 361–74
- Lake RA & Robinson BWS (2005) Immunotherapy and chemotherapy--a practical partnership. *Nat. Rev. Cancer* **5**: 397–405
- Lartigau E, Randrianarivelo H, Avril MF, Margulis A, Spatz A, Eschwège F & Guichard M (1997) Intratumoral oxygen tension in metastatic melanoma. *Melanoma Res.* **7**: 400–406
- Lechuga LM (2011) Nanomedicina: aplicación de la nanotecnología en la salud. *Biotechnología Aplicada a la Salud Humana*, 9, Edición, 100–102.
- Li H, DeRosier DJ, Nicholson W V, Nogales E & Downing KH (2002) Microtubule structure at 8 Å resolution. *Structure* **10**: 1317–28
- Liu J, Erogbogbo F, Yong K-T, Ye L, Liu J, Hu R, Chen H, Hu Y, Yang Y, Yang J, Roy I, Karker NA, Swihart MT & Prasad PN (2013) Assessing clinical prospects of silicon quantum dots: studies in mice and monkeys. *ACS Nano* **7**: 7303–10
- Liu X, Marangon I, Melinte G, Wilhelm C, Ménard-Moyon C, Pichon BP, Ersen O, Aubertin K,

- Baaziz W, Pham-Huu C, Bégin-Colin S, Bianco A, Gazeau F & Bégin D (2014) Design of covalently functionalized carbon nanotubes filled with metal oxide nanoparticles for imaging, therapy, and magnetic manipulation. *ACS Nano* **8**: 11290–304
- Fanarraga ML, Valiente Barroso R & González Gómez JA (2014) Composición de nanofilamentos para el tratamiento de tumores.
- Lu JP (1997) Elastic Properties of Carbon Nanotubes and Nanoropes. *Phys. Rev. Lett.* **79**: 1297–1300
- Ludueña RF (1998) Multiple forms of tubulin: different gene products and covalent modifications. *Int. Rev. Cytol.* **178**: 207–75
- Lum BL, Fisher G a, Brophy N a, Yahanda a M, Adler KM, Kaubisch S, Halsey J & Sikic BI (1993) Clinical trials of modulation of multidrug resistance. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. *Cancer* **72**: 3502–3514
- Luxton GWG & Gundersen GG (2011) Orientation and function of the nuclear-centrosomal axis during cell migration. *Curr. Opin. Cell Biol.* **23**: 579–88 A
- MacRae TH (1997) Tubulin post-translational modifications--enzymes and their mechanisms of action. *Eur. J. Biochem.* **244**: 265–78
- Madani SY, Naderi N, Dissanayake O, Tan A & Seifalian AM (2011) A new era of cancer treatment: carbon nanotubes as drug delivery tools. *Int. J. Nanomedicine* **6**: 2963–79
- Marega R, De Leo F, Pineux F, Sgrignani J, Magistrato A, Naik AD, Garcia Y, Flamant L, Michiels C & Bonifazi D (2013) Functionalized Fe-Filled Multiwalled Carbon Nanotubes as Multifunctional Scaffolds for Magnetization of Cancer Cells. *Adv. Funct. Mater.* **23**: 3173–3184
- Marklund U, Larsson N, Gradin HM, Brattsand G & Gullberg M (1996) Oncoprotein 18 is a phosphorylation-responsive regulator of microtubule dynamics. *EMBO J.* **15**: 5290–8
- Marusyk A, Almendro V & Polyak K (2012) Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer? *Nat. Rev. Cancer* **12**: 323–34
- Matson DR & Stukenberg PT (2011) Spindle poisons and cell fate: a tale of two pathways. *Mol. Interv.* **11**: 141–50
- Mesker WE, Junggeburst JMC, stromal ratio of colon carcinoma is an independent factor for survival compared to lymph node status and tumor stage. *Cell. Oncol.* **29**: 387–98
- Mitchison T & Kirschner M (1984a) Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* **312**: 237–242
- Mitchison T & Kirschner M (1984b) Microtubule assembly nucleated by isolated centrosomes. *Nature* **312**: 232–237
- Montero A, Fossella F, Hortobagyi G & Valero V (2005) Docetaxel for treatment of solid tumours: a systematic review of clinical data. *Lancet. Oncol.* **6**: 229–39
- Monthieux M & Kuznetsov VL (2006) Who should be given the credit for the discovery of carbon nanotubes? *Carbon N. Y.* **44**: 1621–1623
- Musacchio A & Salmon ED (2007) The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**: 379–93
- Navin N, Kendall J, Troge J, Andrews P, Rodgers L, McIndoo J, Cook K, Stepansky A, Levy D, Esposito D, Muthuswamy L, Krasnitz A, McCombie WR, Hicks J & Wigler M (2011) Tumour evolution inferred by single-cell sequencing. *Nature* **472**: 90–4
- Negrini S, Gorgoulis VG & Halazonetis TD (2010) Genomic instability an evolving hallmark of cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**: 220–8
- Noble RL, Beer CT & Cutts JH (1958) Role of chance observations in chemotherapy: Vinca rosea. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **76**: 882–94
- Nogales E, Downing KH, Amos LA & Löwe J (1998) Tubulin and FtsZ form a distinct family of

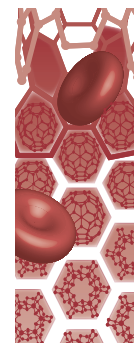
- GTPases. *Nat. Struct. Biol.* **5**: 451–458
- Nogales E, Whittaker M, Milligan R a. & Downing KH (1999) High-resolution model of the microtubule. *Cell* **96**: 79–88
- Norbury C & Nurse P (1992) Animal cell cycles and their xontrol. *Annu. Rev. Biochem.* **61**: 441–468
- Novoselov KS, Geim AK, Morozov S V, Jiang D, Zhang Y, Dubonos S V, Grigorieva I V & Firsov AA (2004) Electric field effect in atomically thin carbon films. *Science* **306**: 666–9
- Oakley BR (2000) An abundance of tubulins. *Trends Cell Biol.* **10**: 537–42
- Orr GA, Verdier-Pinard P, McDaid H & Horwitz SB (2003) Mechanisms of Taxol resistance related to microtubules. *Oncogene* **22**: 7280–95
- Pampaloni F & Florin EL (2008a) Microtubule architecture: inspiration for novel carbon nanotube-based biomimetic materials. *Trends Biotechnol.* **26**: 302–310
- Parker AL, Kavallaris M & McCarroll JA (2014) Microtubules and their role in cellular stress in cancer. *Front. Oncol.* **4**: 153
- Peigney A, Laurent C, Flahaut E, Bacsá RR & Rousset A (2001) Specific surface area of carbon nanotubes and bundles of carbon nanotubes. *Carbon N. Y.* **39**: 507–514
- Pelaz B, del Pino P, Maffre P, Hartmann R, Gallego M, Rivera-Fernández S, de la Fuente JM, Nienhaus GU & Parak WJ (2015) Surface functionalization of nanoparticles with polyethylene glycol: effects on protein adsorption and cellular uptake. *ACS Nano* **9**: 6996–7008
- Pelicano H, Martin DS, Xu R-H & Huang P (2006) Glycolysis inhibition for anticancer treatment. *Oncogene* **25**: 4633–46
- Peng C, Jin J & Chen GZ (2007) A comparative study on electrochemical co-deposition and capacitance of composite films of conducting polymers and carbon nanotubes. *Electrochim. Acta* **53**: 525–537
- Perez RP, Hamilton TC, Ozols RF & Young RC (1993) Mechanisms and modulation of resistance to chemotherapy in ovarian cancer. *Cancer* **71**: 1571–1580
- Po’uha ST, Shum MSY, Goebel A, Bernard O & Kavallaris M (2010) LIM-kinase 2, a regulator of actin dynamics, is involved in mitotic spindle integrity and sensitivity to microtubule-destabilizing drugs. *Oncogene* **29**: 597–607
- Pollard TD & Cooper JA (2009) Actin, a central player in cell shape and movement. *Science* **326**: 1208–12
- Ponstingl H, Krauhs E, Little M & Kempf T (1981) Complete amino acid sequence of alpha-tubulin from porcine brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **78**: 2757–61
- Portet C, Yushin G & Gogotsi Y (2007) Electrochemical performance of carbon onions, nanodiamonds, carbon black and multiwalled nanotubes in electrical double layer capacitors. *Carbon N. Y.* **45**: 2511–2518
- Qian B-Z & Pollard JW (2010) Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* **141**: 39–51
- Ravelli RBG, Gigant B, Curmi PA, Jourdain I, Lachkar S, Sobel A & Knossow M (2004) Insight into tubulin regulation from a complex with colchicine and a stathmin-like domain. *Nature* **428**: 198–202
- Ren Y & Pastorin G (2008) Incorporation of hexamethylmelamine inside capped carbon nanotubes. *Adv. Mater.* **20**: 2031–2036
- Rezania V, Azarenko O, Jordan MA, Bolterauer H, Ludueña RF, Huzil JT & Tuszynski JA (2008) Microtubule assembly of isotypically purified tubulin and its mixtures. *Biophys. J.* **95**: 1993–2008
- Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT & Horwitz AR (2003) Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* **302**: 1704–9

- Riggio C, Ciofani G, Raffa V, Cuschieri A & Micera S (2009) Combination of polymer technology and carbon nanotube array for the development of an effective drug delivery system at cellular level. *Nanoscale Res. Lett.* **4**: 668–73
- Rodríguez-Fernández L, Valiente R, Gonzalez J, Villegas JC & Fanarraga ML (2012) Multiwalled carbon nanotubes display microtubule biomimetic properties *in vivo*, enhancing microtubule assembly and stabilization. *ACS Nano* **6**: 6614–6625
- Ruiz-Ontañón P, Orgaz JL, Aldaz B, Elosegui-Artola A, Martino J, Berciano MT, Montero J a., Grande L, Nogueira L, Diaz-Moralli S, Esparís-Ogando A, Vazquez-Barquero A, Lafarga M, Pandiella A, Cascante M, Segura V, Martinez-Climent J A., Sanz-Moreno V & Fernandez-Luna JL (2013) Cellular plasticity confers migratory and invasive advantages to a population of glioblastoma-initiating cells that infiltrate peritumoral tissue. *Stem Cells* **31**: 1075–1085
- Sailor MJ & Park J-H (2012) Hybrid nanoparticles for detection and treatment of cancer. *Adv. Mater.* **24**: 3779–802
- Sanchez-Valencia JR, Dienel T, Gröning O, Shorubalko I, Mueller A, Jansen M, Amsharov K, Ruffieux P & Fasel R (2014) Controlled synthesis of single-chirality carbon nanotubes. *Nature* **512**: 61–4
- Saptarshi SR, Duschl A & Lopata AL (2013) Interaction of nanoparticles with proteins: relation to bio-reactivity of the nanoparticle. *J. Nanobiotechnology* **11**: 26
- Scheinberg DA, McDevitt MR, Dao T, Mulvey JJ, Feinberg E & Alidori S (2013) Carbon nanotubes as vaccine scaffolds. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **65**: 2016–22
- Schreiber RD, Old LJ & Smyth MJ (2011) Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* **331**: 1565–70
- Schroeder A, Heller DA, Winslow MM, Dahlman JE, Pratt GW, Langer R, Jacks T & Anderson DG (2012) Treating metastatic cancer with nanotechnology. *Nat. Rev. Cancer* **12**: 39–50
- Seigneuric R, Markey L, Nuyten DS a, Dubernet C, Evelo CT a, Finot E & Garrido C (2010) From nanotechnology to nanomedicine: applications to cancer research. *Curr. Mol. Med.* **10**: 640–652
- Sengupta B, Gregory WE, Zhu J, Dasetty S, Karakaya M, Brown JM, Rao AM, Barrows JK, Sarupria S & Podila R (2015) Influence of carbon nanomaterial defects on the formation of protein corona. *RSC Adv.* **5**: 82395–82402
- Serpell CJ, Kostarelos K & Davis BG (2016) Can Carbon Nanotubes Deliver on Their Promise in Biology? Harnessing Unique Properties for Unparalleled Applications. *ACS Cent. Sci.* **2**: acscentsci.6b00005
- Sève P & Dumontet C (2008) Is class III beta-tubulin a predictive factor in patients receiving tubulin-binding agents? *Lancet. Oncol.* **9**: 168–75
- Sharp DJ, Rogers GC & Scholey JM (2000) Microtubule motors in mitosis. *Nature* **407**: 41–7
- Sherr CJ & McCormick F (2002) The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* **2**: 103–112
- Shi X, von dem Bussche A, Hurt RH, Kane AB & Gao H (2011) Cell entry of one-dimensional nanomaterials occurs by tip recognition and rotation. *Nat. Nanotechnol.* **6**: 714–9
- Shoval A, Adams C, David-Pur M, Shein M, Hanein Y & Sernagor E (2009) Carbon nanotube electrodes for effective interfacing with retinal tissue. *Front. Neuroeng.* **2**: 4
- Simon P & Gogotsi Y (2008) Materials for electrochemical capacitors. *Nat. Mater.* **7**: 845–54
- Simpson CD, Anyiwe K & Schimmer AD (2008) Anoikis resistance and tumor metastasis. *Cancer Lett.* **272**: 177–85
- Solecki DJ, Govek E-E, Tomoda T & Hatten ME (2006) Neuronal polarity in CNS development. *Genes Dev.* **20**: 2639–47
- Stavrovskaya a a (2000) Cellular mechanisms of multidrug resistance of tumor cells. *Biochemistry.*

- (*Mosc*). **65**: 95–106
- Sullivan KF & Cleveland DW (1986) Identification of conserved isotype-defining variable region sequences for four vertebrate beta tubulin polypeptide classes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**: 4327–31
- Sun W (2012) Angiogenesis in metastatic colorectal cancer and the benefits of targeted therapy. *J. Hematol. Oncol.* **5**: 63
- Taniguchi N (1974) On the basic concept of 'Nano-Technology'.
- Tomayko MM & Reynolds CP (1989) Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **24**: 148–154
- Treacy MMJ, Ebbesen TW & Gibson JM (1996) Exceptionally high Young's modulus observed for individual carbon nanotubes. *Nature* **381**: 678–680
- Van Beneden E (1883) Recherches sur la maturation de l'œuf et la fécondation. *Arch Biol* **4**: 265–638
- Van Oijen MG & Slootweg PJ (2000) Gain-of-function mutations in the tumor suppressor gene p53. *Clin. Cancer Res.* **6**: 2138–45
- Vermeulen K, Van Bockstaele DR & Berneman ZN (2003) The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* **36**: 131–49
- Verrills NM & Kavallaris M (2005) Improving the targeting of tubulin-binding agents: lessons from drug resistance studies. *Curr. Pharm. Des.* **11**: 1719–33
- Verrills NM, Liem NL, Liaw TYE, Hood BD, Lock RB & Kavallaris M (2006) Proteomic analysis reveals a novel role for the actin cytoskeleton in vincristine resistant childhood leukemia--an in vivo study. *Proteomics* **6**: 1681–94
- Walczak CE, Cai S & Khodjakov A (2010) Mechanisms of chromosome behaviour during mitosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**: 91–102
- Walker RA, O'Brien ET, Pryer NK, Soboeiro MF, Voter WA, Erickson HP & Salmon ED (1988) Dynamic instability of individual microtubules analyzed by video light microscopy: rate constants and transition frequencies. *J. Cell Biol.* **107**: 1437–48
- Wang J, Byrne JD, Napier ME & DeSimone JM (2011) More effective nanomedicines through particle design. *Small* **7**: 1919–31
- Wang R, Billone PS & Mullett WM (2012) Nanomedicine in Action: An Overview of Cancer Nanomedicine on the Market and in Clinical Trials. **2013**: 12
- Warburg O, Wind F & Negelein E (1927) The metabolism of tumors in the body. *J. Gen. Physiol.* **8**: 519–30
- Waterman-Storer CM & Salmon ED (1997) Actomyosin-based retrograde flow of microtubules in the lamella of migrating epithelial cells influences microtubule dynamic instability and turnover and is associated with microtubule breakage and treadmilling. *J. Cell Biol.* **139**: 417–34
- Weisenberg RC (1972) Microtubule formation *in vitro* in solutions containing low calcium concentrations. *Science* **177**: 1104–5
- Wilder JWG, Venema LC, Rinzler AG, Smalley RE & Dekker C (1998) Electronic structure of atomically resolved carbon nanotubes. *Nature* **391**: 59–62
- Yang K & Xing B (2009) Adsorption of fulvic acid by carbon nanotubes from water. *Environ. Pollut.* **157**: 1095–100
- Yen C-Y, Lin Y-F, Liao S-H, Weng C-C, Huang C-C, Hsiao Y-H, Ma C-CM, Chang M-C, Shao H, Tsai M-C, Hsieh C-K, Tsai C-H & Weng F-B (2008) Preparation and properties of a carbon nanotube-based nanocomposite photoanode for dye-sensitized solar cells. *Nanotechnology* **19**: 375305
- Yeung SJ, Pan J & Lee M-H (2008) Roles of p53, MYC and HIF-1 in regulating glycolysis - the

- seventh hallmark of cancer. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**: 3981–99
- Zhang W, Zhang Z & Zhang Y (2011) The application of carbon nanotubes in target drug delivery systems for cancer therapies. *Nanoscale Res. Lett.* **6**: 555
- Zhao B, Hu H, Mandal SK & Haddon RC (2005) A Bone Mimic Based on the Self-Assembly of Hydroxyapatite on Chemically Functionalized Single-Walled Carbon Nanotubes. *Chem. Mater.* **17**: 3235–3241
- Zhao F, Zhao Y, Liu Y, Chang X, Chen C & Zhao Y (2011) Cellular uptake, intracellular trafficking, and cytotoxicity of nanomaterials. *Small* **7**: 1322–37
- Zhao Y, Alakhova DY & Kabanov A V (2013) Can nanomedicines kill cancer stem cells? *Adv. Drug Deliv. Rev.* **65**: 1763–83
- Zheng Y, Wong ML, Alberts B & Mitchison T (1995) Nucleation of microtubule assembly by a gamma-tubulin-containing ring complex. *Nature* **378**: 578–83
- Zhong J, Song L, Meng J, Gao B, Chu W, Xu H, Luo Y, Guo J, Marcelli A, Xie S & Wu Z (2009) Bio–nano interaction of proteins adsorbed on single-walled carbon nanotubes. *Carbon N. Y.* **47**: 967–973
- Zhou J & Giannakakou P (2005) Targeting microtubules for cancer chemotherapy. *Curr. Med. Chem. Anticancer. Agents* **5**: 65–71

VIII. ARTÍCULOS



Nanotube interactions with microtubules: implications for cancer medicine

Carbon nanotubes (CNTs) and microtubules are both hollow nanofibers and have similar dimensions; they both self-assemble and form bundles. These common features prompt their association into biosynthetic polymers *in vitro* and *in vivo*. Unlike CNTs, microtubules are highly dynamic protein polymers essential for cell proliferation and migration. Interaction between these filaments inside live cells leads to microtubule dysfunction, mitotic arrest and cell death. Thus, CNTs behave as spindle poisons, same as taxanes, vinca alkaloids or epotilones. Recent findings support the idea that CNTs represent a ground-breaking type of synthetic microtubule-stabilizing agents that could play a pivotal role in future cancer treatments in combination to traditional antineoplastic drugs. Here we review the potential use of CNTs in cancer medicine.

Keywords: biomimetics • biosynthetic polymers • carbon nanotubues • cell proliferation • cytoskeleton • microtubule stability • tubulin polymerization

Cancer cell growth is governed by many forces that trigger numerous cellular adaptive strategies that continuously select the most resistant cell phenotypes within the tumor cell mass. This is why drug resistance is inherent to the nature of the cell transformation process. In this sense, the use of nanomaterials has the potential to completely transform the traditional antineoplastic treatments. Nanotherapies use completely different strategies to kill cells and do not require druggable target cancer-promoting genes or proteins to function. This means that the effect of these nanomaterials is invulnerable to most genetic adaptations that cancer cells undergo to escape the control of traditional drugs. Among nanomaterials, carbon nanotubes (CNTs) show interesting properties, interacting with the cell cytoskeleton, modifying the cell biomechanics, and interfering with cell division and movement. Unfortunately, CNTs have also been blamed for producing many side effects, including cancer. But this is also the case for other classical anticancer drugs active against a broad range of tumors. No doubt further biodistribution and bioaccumulation studies should

be performed in order to determine dosages, administration routes and how to enhance the biodegradation of CNTs, which are made of carbon, a fully compatible chemical. The answers to these questions will determine whether CNTs can play important roles as neoadjuvant or adjuvant therapies against cancer, locally or systemically. Here we review the molecular mechanisms of the cytotoxic effects of CNT in cancer cells in comparison with those of traditional microtubule-binding drugs.

The microtubule cytoskeleton

The cellular cytoskeleton is fundamental for the spatial organization of eukaryotic cells, for migration and cell division. There are three types of cytoskeletal filaments in mammalian eukaryotic cells: microtubules, actin microfilaments and intermediate filaments. Microtubules are highly versatile structures of the eukaryotic cell cytoskeleton that are crucial in cell division, cell movement, intracellular organelle distribution, membrane/vesicle trafficking and others. From a structural point of view, microtubules display a remarkable molecular organization. These

Lorena García-Hevia¹,
Fidel Fernández²,
Cristina Grávalos³,
Almudena García³,
Juan C Villegas⁴
& Mónica L Fanarraga^{*1}

¹Departamento de Biología Molecular, Universidad de Cantabria-IDIVAL, Santander 39011, Spain

²Ciencias Médicas y Quirúrgicas, Universidad de Cantabria-IDIVAL, Santander 39011, Spain

³Servicio de Oncología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander 39008, Spain

⁴Departamento de Anatomía y Biología Celular, Universidad de Cantabria-IDIVAL, Santander 39011, Spain

*Author for correspondence:

Tel.: +34 942 202 067

Fax: +34 942 201 945

fanarraga@unican.es

Future
Medicine

part of
fsg

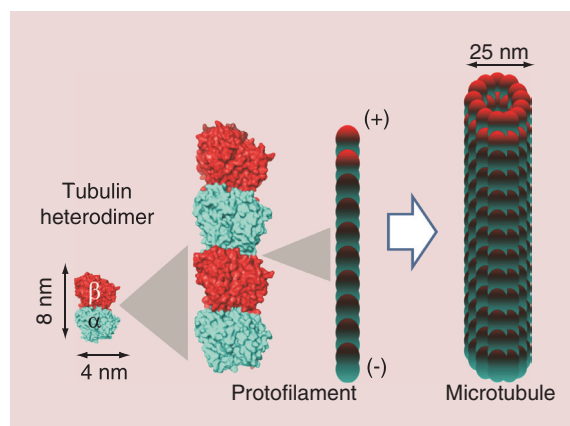


Figure 1. Microtubule structure. Microtubules are constituted of protein blocks formed by the association of two different protein polypeptides, one α -tubulin (blue) and one β -tubulin (red) molecules [1,2]. The $\alpha\beta$ -tubulin subunits align in a head-to-tail fashion providing microtubules with an intrinsic polarity starting always with α -tubulin at the less dynamic (-) extreme, and ending with a β -tubulin ring at the most dynamic end (+) [3,4].

Please see all color figures online at www.futuremedicine.com/doi/pdf/10.2217/nmm.14.68.

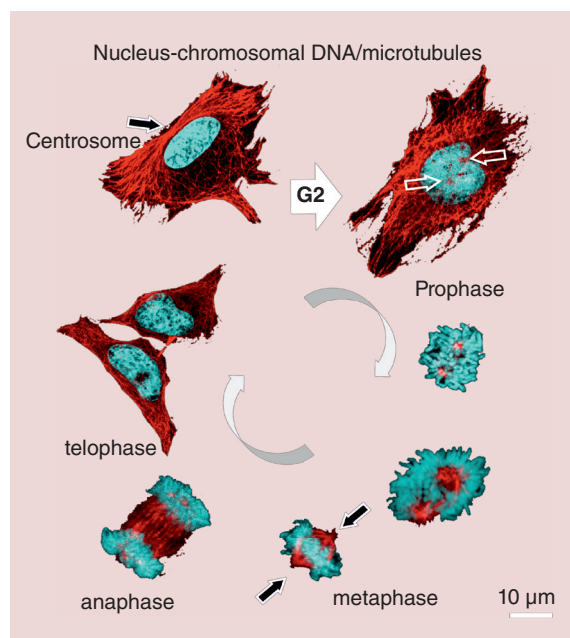


Figure 2. Microtubule cytoskeleton and DNA patterns during the cell division: confocal microscopy images of dividing HeLa cells. The microtubule cytoskeleton is visible in the red channel and the DNA in blue. The array of microtubules in the cells is highly dynamic (red filaments). Before mitosis, a new centrosome is generated. This centrosome is first visible at prophase (arrows) assembling a second microtubule array that will ultimately organize a symmetric mitotic spindle in metaphase. Centrosome positioning in the mitotic spindle is shown. During anaphase, sister chromatids are pulled apart from each other by the midzone microtubules.

filaments are 25 nm diameter tubular polymers constituted of $\alpha\beta$ -tubulin heterodimers (Figure 1) [1,2]. There are many different α - and β -tubulin varieties that can be combined into pairs to form the tubulin heterodimer, the basic microtubule building block. Thus, microtubules are assembled and customized according to the requirements of the cell.

Microtubules are polar polymers. The nature of the tubulin heterodimer provides microtubules with an intrinsic polarity resulting in the head-to-tail alignment of the $\alpha\beta$ -tubulin heterodimers into 13 protofilaments (Figure 1), starting always with an α -tubulin ring at the less dynamic (-) extreme, and ending with a β -tubulin ring at the most dynamic end (+) [3,4]. As a rule, the (-) end is always located at the centrosome, close to the nucleus, while the (+) end, much more dynamic, is located at the cell periphery [5–7]. The centrosomal organization of the microtubule cytoskeleton typically produces a radial filament pattern that is crucial for the organization of the intracellular vesicular trafficking and organelle positioning in interphase cells [1,5]. During cell division, there is a progressive depolymerization of the interphase microtubular array and the radial microtubule pattern is reorganized to assemble the mitotic spindle (Figure 2). At this point, microtubules become highly dynamic, increasing their dynamicity 20–100-fold [2,4,6–8].

Traditional anticancer treatments based on microtubule dynamic-interfering agents

Current studies have shown that mutations in several hundred human genes become serious drivers of the abnormal cell growth and division process that generates human cancer [9]. However, targeted therapies against these genes or their products are often effective transiently until the cancer evolves resistance to these treatments. On the other hand, there are some traditional anticancer drugs that have been used for over 50 years and are effective against a broad range of tumors. These drugs are a series of different compounds that typically target microtubules and interfere with their dynamics behaving either as microtubule-destabilizing or microtubule-stabilizing agents [10–13]. Both types of drugs inhibit the correct alignment of chromosomes at metaphase and the assembly of the mitotic spindle, behaving as spindle poisons, blocking cells in metaphase [10]. When mitosis does not progress normally, a mechanism that monitors the correct alignment of chromosomes at metaphase called spindle assembly checkpoint (SAC) is continuously activated. Prolonged activation of the SAC in cells eventually triggers cell death by apoptosis, or via other less understood mechanisms, largely known as mitotic

catastrophe [11]. This machinery prevents genomic instability and aneuploidy (aberrant chromosomal numbers), and it is the mechanism these drugs use to kill tumor cells and defeat cancer.

Since cell division is inherent to cancer, independent of the particular genetics that have led to cell transformation, blocking cell proliferation by interfering with the microtubule machinery is a phenotypic way to treat any cancer [10–13]. This is why the traditional anticancer treatments based on microtubule dynamic-interfering agents mentioned above are still in use. There are two major families of drugs, depending on their action on microtubules. Among these, colchicine and analogs, such as the vinca alkaloids, are some of the microtubule-destabilizing or microtubule-polymerization inhibitor agents. Colchicine binds the β -tubulin polypeptide producing conformational changes in the tubulin heterodimer that prevents microtubule protofilament assembly (Figure 3, top left) [14]. Colchicine binding to tubulin leads to the complete disassembly of the microtubule array (Figure 4), blocking cell division, and provoking metaphase arrest and finally, cell death [14]. The drugs of the vinca alkaloid family (vinblastine, vincristine, vindesine, vinorelbine and vinflunine) also bind the intratubulin interaction region, thus preventing the assembly of tubulin heterodimers into filaments (Figure 3, top right) [15]. All these microtubule polymerization inhibitor antineoplastic drugs are widely used either as single agents, or in combination with other drugs.

The other class of microtubule dynamic-interfering agents promotes microtubule stabilization, inhibiting the disassembly of the tubulin polymer. This is why these drugs are generally referred to as microtubule-stabilizing agents or depolymerization inhibitors. These molecules, namely taxanes (paclitaxel, docetaxel and cabazitaxel) bind to a lateral interaction pocket localized in the polymerized β -tubulin molecule (Figure 3, bottom left). This binding produces structural changes in the tubulin heterodimer that stabilize the protofilament, changing the $\alpha\beta$ -tubulin molecule conformation and inhibiting microtubule depolymerization, also enhancing tubulin ectopic (noncentrosomal) nucleation (Figure 4, bottom right). Microtubules assembled in the presence of these drugs are short, stable and display a random organization in the cell [16]. Binding of these drugs to microtubules leads to the assembly of aberrant spindles, often multipolar (Figure 4, empty arrows), cell cycle arrest at the G2/M transition phase, and finally apoptosis [16,17]. Taxanes are active against many different types of tumors, including breast, esophageal and gastric, head and neck, ovarian, lung, and prostate cancers, and are efficaciously used in combination with neoadjuvant

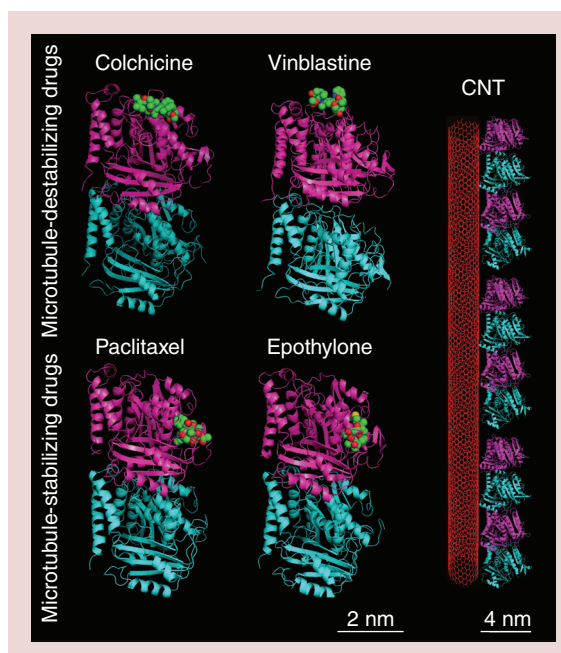


Figure 3. Tubulin target sites for different drugs and carbon nanotubes. Structures of the tubulin heterodimer bond to microtubule-destabilizing drugs (top) and microtubule-stabilizing drugs (bottom). The α -tubulin (blue) and β -tubulin polypeptides (magenta) and the molecular target sites of the different compounds (in green) are shown (NCBI databank ID numbers: 3E22, 4I4T, 1JFF and 1TVK, respectively). Right is a model of the lateral interaction between a CNT (red) and a tubulin protofilament. CNT: Carbon nanotube.

radiotherapy (Figure 5). There is a novel class of microtubule-stabilizing agents originally identified as metabolites of the myxobacterium *Sorangium cellulosum*, known as epothilones, which also bind to the same site on the β -tubulin molecule (Figure 3) [18]. Both semi- and totally-synthetic epothilone analogues (ixabepilone, sagopilone and patupilone) are currently undergoing various clinical development phases to treat different cancers and have demonstrated a potent cytotoxic activity even in taxane-refractory cancers, in addition to less-toxic side effects [19].

Unfortunately, cancer cells have found several ways to bypass the effects of all these microtubule-interfering drugs. These mechanisms include: mutations in the binding site of the drug to the tubulin molecule; post-translational modifications to tubulin that interfere with drug binding; changes to the tubulin/microtubule-regulatory proteins; or even changes in the tubulin composition of microtubules. In addition, cancer cells can modify signaling pathways to shorten or promote a weak SAC to undergo a precocious mitotic exit by a mechanism called mitotic slippage, thus avoiding the drug-triggered apoptotic effect [21]. Therefore, despite new natural microtubule-interfering

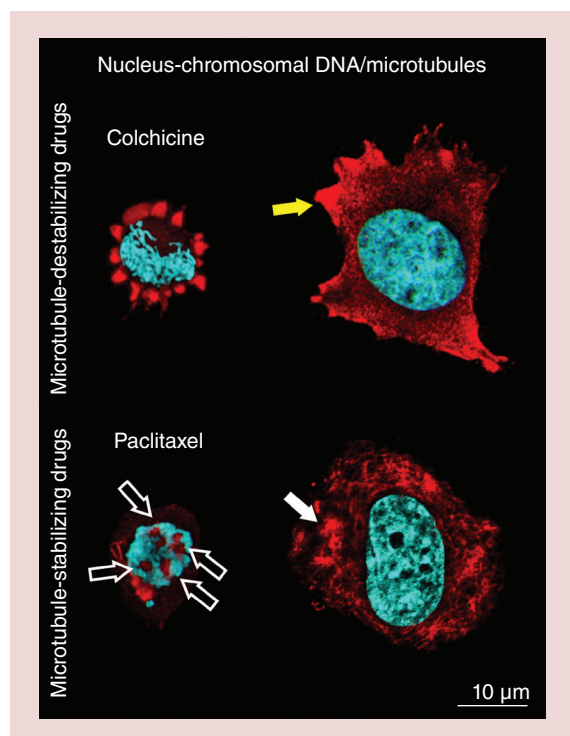


Figure 4. Microtubule cytoskeleton of HeLa cells treated with microtubule-interfering drugs. Confocal micrographs of the microtubule cytoskeleton of HeLa cells treated with 100 nm colchicine (top) and paclitaxel (bottom) during 16 h in the culture medium, and immunostained with antitubulin (red). Nuclear DNA is shown in blue. Both types of microtubule-interfering drugs behave as spindle poisons (left). Cells treated with colchicine display no polymerized tubulin (top). Instead, unstructured cytoplasmic tubulin accumulations (yellow arrow) are observed. Paclitaxel treatment, originates several microtubule nucleation centers within the chromosomal mass in mitotic cells (empty arrows) resulting in aberrant multipolar spindles (bottom). In interphase cells, short, dense and noncentrosomal microtubule bundles are observed (solid arrow).

compounds, such as the halichondrins being tested to overcome resistance to the above chemotherapeutic drugs [22,23], the genomic instability inherent to cancer plays an active process in driving tumor evolution towards resistance. Moreover, experts in microtubule dynamics suggest that the best way to circumvent cancer drug resistance to microtubule-interfering agents could be hindering mitotic exit downstream of the SAC, inhibiting mitotic slippage in order to enhance the drug cytotoxic effect [24].

Biomimetic interaction between microtubules & carbon nanotubes

Microtubules and CNTs share many properties. Both have similar dimensions and are empty filaments constituted of subunits that self-assemble [25].

They are also highly flexible and display a significant resiliency. The major difference between these two nanofilaments is their dynamic behavior. While microtubules are, in general terms, very dynamic polymers that continuously undergo assembly–disassembly cycles on the time scale of seconds [6], CNTs are very stable.

Similarities between microtubules and CNTs support their interaction both *in vitro* and *in vivo* [25–28]. *In vitro*, CNTs assemble mixed polymers with tubulin, where tubulin encapsulates CNTs and produces functional hybrid assemblies [26,27]. Moreover, these polymers also interact *in vivo* inside cells [28]. Our previous work demonstrates how intracellular multiwalled CNTs interact with microtubules longitudinally, and how this interaction provokes important changes in the microtubule cytoskeletal array derived of the microtubule stabilization effect triggered by CNTs. Electron microscopy images show how intracellular CNTs intermingle with tubulin, and associate longitudinally with microtubules assembling biosynthetic polymers. This fact produces a scaffolding effect on microtubules, which supports ectopic (noncentrosomal) tubulin nucleation, tubulin assembly and microtubule stability [27]. This interaction is likely to be based on the morphological properties shared by multiwalled CNTs and the microtubule polymers.

Indeed, CNTs have long been known to trigger mitotic aberrations and chromosome malsegregation, resulting in their interaction with the mitotic apparatus [29–32]. Thus, it should also be considered that different CNTs, with different diameters and lengths, could lead to different cytotoxic effects depending on their sizes, selectively interacting with different intracellular filaments, namely DNA, RNA, microtubules, actin or intermediate filaments [29,30,33,34]. Indeed, a similar biomimetic effect of microtubule cytoskeleton disorganization, has been reported for nanofibers assembled of small hydrophobic molecules [35]. This fact suggests that is not the nature of the CNTs itself that interferes with microtubules, but rather their morphological features that are important for this interaction.

CNTs inhibit cell division & cell migration, & trigger apoptosis in dividing cells

All the described effects indicate that CNTs behave as microtubule-stabilizing agents. CNTs prompt the detachment of the microtubule (–) ends from the centrosome, disorganizing the radial pattern of the microtubule cytoskeleton, leading to centrosomal aberrations, which have important deleterious effects

in dividing cells (Figure 6). During mitosis, CNTs behave as microtubule spindle poisons, severely interfering with spindle microtubule dynamics, leading to spindle assembly errors, maintaining activation of the SAC, and finally leading to mitotic catastrophe, triggering cell death by apoptosis [28–32]. All these effects are identical to those previously described for the microtubule dynamic-interfering drugs, which promote microtubule stabilization. However, despite this microtubule-stabilizing mimetic effect, CNT binding to microtubules is completely different to that of any of the mentioned microtubule-binding drugs (a model of the lateral interaction of a single CNT with a tubulin protofilament is shown in Figure 3). While these molecules bind small contact regions, or pockets within the β -tubulin polypeptide, CNTs bind along the lateral side of the tubulin filaments. This interaction produces a large intermolecular contact between the CNT and the tubulin polymer, which is presumably much more stable than that produced by any of those drugs. Moreover, this lateral intermolecular contact is not affected by the isotype composition of the tubulin polymer, and it is quite unlikely to be modified by single point mutations in the tubulin genes, thus we believe genetic resistance to the antiproliferative effect of CNTs is highly unprovable. This biomimetic interaction is most likely to boost the cytotoxic effect of any anticancer drug, delaying mitotic exit and preventing mitotic slippage [24]. Furthermore, CNTs disorganize the microtubule radial pattern in nondividing cells. This fact also has important effects in cell biomechanics including migration [36,37] and represents another interesting property of CNTs that could be exploited to inhibit cell spreading and metastasis, the cause of most cancer deaths.

Unfortunately, there are also many studies that demonstrate that CNTs are able to trigger numerous unwanted toxic side effects in many cells and tissues [38,39] including inflammatory reactions, cytotoxic and genotoxic effects, DNA breakage, chromosomal malsegregation (known as aneuploidy), and also cancer [28,31,32]. Hence, there are many features of these nanomaterials that must be investigated and improved before they could be used in patients to decrease the side effects, while producing a maximum well-targeted cytotoxic effect. These include: investigating the role of the morphology and functionalization in cytotoxicity; chemical modifications required to turn CNTs into more biocompatible/biodegradable materials; and CNT functionalization to improve targeting *in vivo*, among others. In the meantime, choosing the best route for administration could be the way to circumvent systemic toxicity. For instance: injecting the CNTs inside the tumor before surgery;

injecting the CNTs in the vicinities after excision; or applying CNTs locally as a topical treatment, for instance. We believe CNTs could be used in the nearest future as adjuvant therapies against cancer to overcome antitumoral drug resistance.

Conclusion

Antimitotic spindle poisons are among the most important chemotherapeutic agents available. Microtubule-directed antimitotic drugs, such as paclitaxel, vinblastine and derivatives, are classical anticancer drugs active against a broad range of cancers. Unfortunately, cancer cells continually undergo genetic adaptations to escape the control of these drugs, such as gene mutations leading to structural changes in the tubulin molecule, which inhibit the interaction of these drugs with their target sites. These facts urge us to find new strategies for cancer therapy. Nanomaterials applied to cancer treatment can provide radically different ways of treating cancer. CNTs share many characteristics with microtubules, prompting their interaction. Recent studies show how these nanomaterials have the intrinsic ability to bind to microtubules *in vivo*, severely interfering with the dynamics of these tubulin polymers, enhancing microtubule stabilization and producing similar effects to the aforementioned anticancer microtubule-binding stabilizing agents. Since CNTs interact

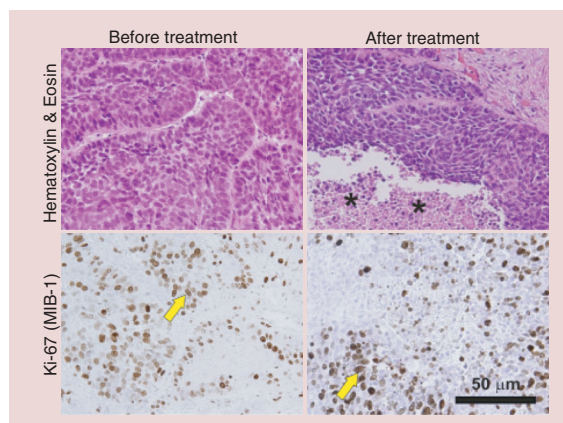


Figure 5. Antimitotic effect of taxanes. Section of a biopsy of a human esophageal squamous cell carcinoma before and after the treatment taxanes and a neoadjuvant radiotherapy. Hematoxylin & eosin staining shows a rise of necrotic cells after treatment (top). These cells are recognized by a collapsed, darkened and fragmented nucleus and karyolysis (asterisks). Ki-67 (MIB-1) immunostaining [20], a classical tumor nuclear cell proliferation and prognostic marker, demonstrates a high mitotic index in the tumor cells (yellow arrows) in this patient after treatment with these therapies. The response of this tumor demonstrates cell resistance to the cytotoxic effects of taxanes and adjuvant therapies (bottom).

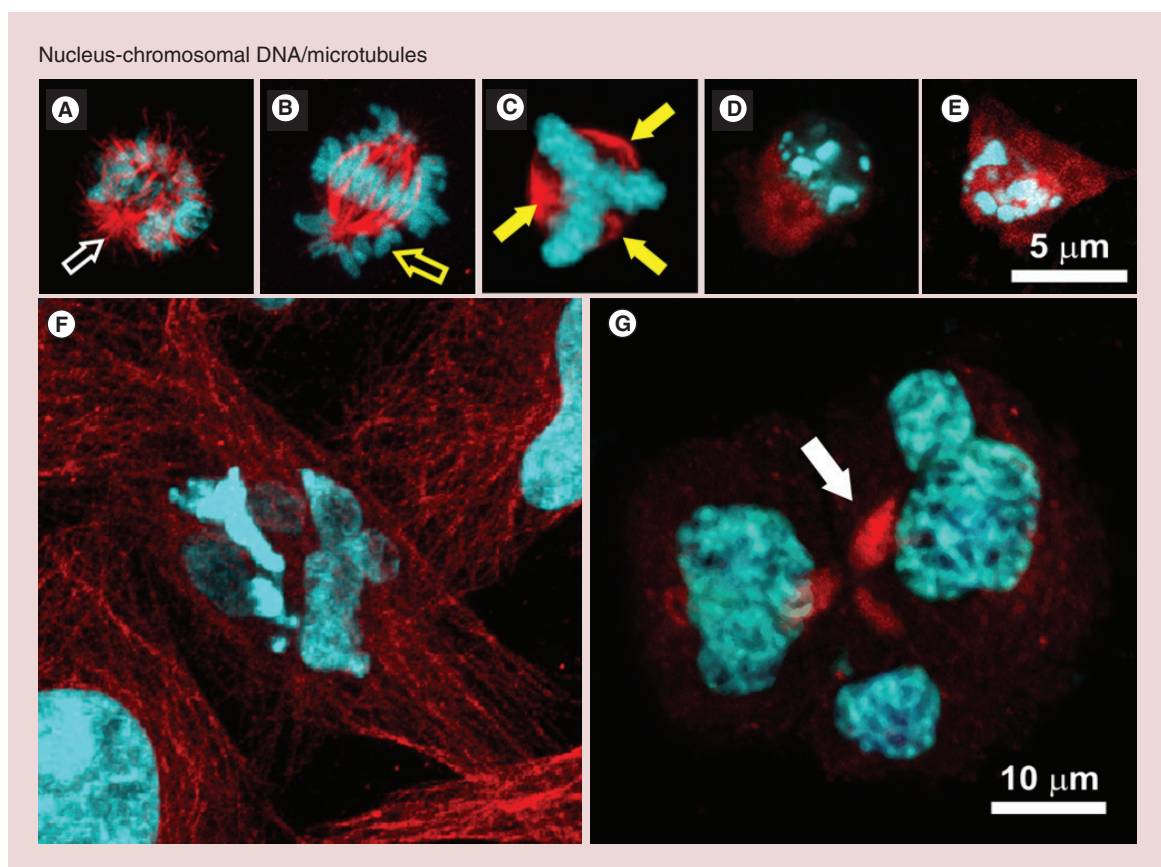


Figure 6. Carbon nanotubes interfere with cancer cell proliferation leading to cell death. (A–G) Confocal microscopy images of 70 h carbon nanotube-treated HeLa cells displaying different mitotic spindle aberrations and apoptosis. Microtubules are immunostained with antitubulin antibody (red channel) and the nuclear/chromosomal DNA stained with Hoechst (blue channel). (A) Unfocused spindle poles (white empty arrow), (B) misplaced chromosomes (yellow empty arrow) and (C) multipolar spindles (filled yellow arrows) are shown. (D–F) Fragmented nuclei (blue channel), a typical feature of apoptosis, are a frequent finding in carbon nanotube-treated cells. (G) Image of a tripolar asymmetric telophase in CNT-treated cells. The white arrow points at the midbody microtubules.

along the tubulin polymer and do not specifically bind to a particular structural pocket or target site in the tubulin molecule, we believe these nanomaterials could play important roles as neoadjuvant or adjuvant therapies against cancer, boosting the cytotoxic effects of the aforementioned microtubule-interacting chemotherapies, such as paclitaxel, and preventing the appearance of resistance to these drugs.

Future perspective

Understanding the relationship between CNTs and microtubules could drive nanomedicine a step closer towards the generation of nanomaterials for chemotherapy. CNTs could be ideal anticancer treatments since: they are made of carbon, which is a fully compatible chemical; they are capable of penetrating tissues and mammalian cell membranes; and they are able to interfere with both the proliferative and biomechanical cellular mechanisms. Moreover, CNTs can also carry drugs, nanoparticles or nucleic acids inside tumor cells

to enhance their intrinsic effect. Future studies will provide new clues about the dosages, administration routes, and modifications required to turn CNTs into biocompatible anticancer drugs and how to improve the delivery of these nanomaterials to target cells. Paraphrasing Paracelsus, “the dose makes the poison.”

Acknowledgements

The authors would like to thank L Alvarez for her technical help, and R Valiente and J González for their helpful scientific discussions. ML Fanarraga is very grateful to JM Ortiz-Melon for having contributed to the establishment of the Nanomedicine Laboratory of the Universidad de Cantabria-IDIVAL with equipment. The authors are also grateful to the Nikon A1R Laser Microscopy Unit of the IDIVAL Institute for the confocal microscopy imaging.

Financial & competing interests disclosure

This work has been supported by the Spanish MINECO Project Ref. PI13/01074 (AES 2013) and private funding from the

Fundación Eugenio Rodríguez Pascual (Ayudas a la Investigación Biomédica 2013). The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the

subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

Executive summary

The microtubule polymers & cancer treatment

- Microtubules are intracellular protein polymers that are implicated in cell proliferation, migration and cell shape maintenance, and exhibit a great dynamicity.
- Microtubular dynamics is crucial during mitosis. Interference with microtubule function results in aberrant spindles that maintain activation of the spindle assembly checkpoint (SAC), finally triggering cell death.

Microtubule dynamic-interfering agents are phenotype-directed anticancer treatments

- Cell proliferation is the main phenotype in cancer cells resulting in thousands of different mutations.
- Microtubule dynamic-interfering agents are traditional anticancer treatments effective against many different tumors.
- These drugs behave as spindle poisons, maintaining activation of the SAC, finally triggering a cytotoxic effect in cancer cells.
- The genomic instability inherent to cancer cells prompts the development of genetic resistance mechanisms to the traditional microtubule-interfering drugs.

The biomimetic interaction between microtubules & CNTs produces an antiproliferative & proapoptotic effect

- Carbon nanotubes (CNTs) and microtubules share many structural properties that favor their biomimetic interaction.
- CNTs bind longitudinally to tubulin polymers and interfere with their dynamics, behaving as microtubule-stabilizing drugs.
- CNTs produce spindle aberrations, maintaining activation of the SAC, inhibiting cell proliferation and having a cytotoxic effect in cancer cells.
- The large intramolecular interaction between the tubulin polymer and CNTs makes improbable the development of genetic resistance to the antiproliferative and cytotoxic effect.

References

Papers of special note have been highlighted as:

• of interest; •• of considerable interest

- Mitchison T, Kirschner M. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 312, 237–242 (1984).
- Nogales E, Whittaker M, Milligan RA, Downing KH. High-resolution model of the microtubule. *Cell* 96, 79–88 (1999).
- Chretien D, Fuller SD, Karsenti E. Structure of growing microtubule ends: two-dimensional sheets close into tubes at variable rates. *J. Cell Biol.* 129, 1311–1328 (1995).
- Mitchison TJ. Localization of an exchangeable GTP binding site at the plus end of microtubules. *Science* 261, 1044–1047 (1993).
- Tassin A, Bornens M. Centrosome structure and microtubule nucleation in animal cells. *Biol. Cell* 91, 343–354 (1999).
- First publication demonstrating the importance of microtubule centrosomal nucleation to maintain cell integrity and a correct mitotic progression.
- Cassimeris L, Pryer NK, Salmon ED. Real-time observations of microtubule dynamic instability in living cells. *J. Cell Biol.* 107, 2223–2231 (1988).
- Desai A, Mitchison TJ. Microtubule polymerization dynamics. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13, 83–117 (1997).
- Mitchison TJ, Salmon ED. Mitosis: a history of division. *Nat. Cell Biol.* 3, 17–22 (2001).
- Jones S, Zhang X, Parsons DW *et al.* Core signalling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science* 321, 1801–1806 (2008).
- Matson DR, Stukenberg PT. Spindle poisons and cell fate: a tale of two pathways. *Mol. Interv.* 11, 41–150 (2011).
- Finely tuned review that explains the consequences of interference with spindle assembly.
- Jordan MA, Wilson L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat. Rev. Cancer* 4, 253–265 (2004).
- Zhou J, Giannakakou P. Targeting microtubules for cancer chemotherapy. *Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Agents* 5, 65–71 (2005).
- Jordan M. Mechanism of action of antitumour drugs that interact with microtubules and tubulin. *Curr. Med. Chem.* 2(1), 1–17 (2012).
- Together with [11], these publications explain the importance of interfering with the microtubule cytoskeleton to destroy cancer cells.
- Chen J, Liu T, Dong X, Hu Y. Recent development and SAR analysis of colchicine binding site inhibitors. *Mini Rev. Med. Chem.* 9, 1174–1190 (2009).
- Gidding CE, Kellie SJ, Kamps WA, de Graaf SS. Vincristine revisited. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 29, 267–287 (1999).
- De Brabander M, Geuens G, Nuydens R, Willebrords R, De Mey J. Taxol induces the assembly of free microtubules in living cells and blocks the organizing capacity of the

- centrosomes and kinetochores. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 5608–5612 (1981).
- **Explains the molecular interference of paclitaxel in living cells.**
- 17 Alberti C. Cytoskeleton structure and dynamic behavior: quick excursus from basic molecular mechanisms to some implications in cancer chemotherapy. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 13, 13–21 (2009).
 - 18 Alberti C. Taxane- and epothilone-based chemotherapy: from molecule cargo cytoskeletal logistics to management of castration-resistant prostate carcinoma. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 17, 1658–1664 (2013).
 - 19 Kowalski RJ, Giannakakou P, Hamel E. Activities of the microtubule-stabilizing agents epothilones A and B with purified tubulin and in cells resistant to paclitaxel (Taxol®). *J. Biol. Chem.* 272, 2534–2541 (1997).
 - 20 Sarbia M, Bittinger F, Porschen R *et al.* The prognostic significance of tumour cell proliferation in squamous cell carcinomas of the oesophagus. *Br. J. Cancer* 74, 1012–1016 (1996).
 - 21 Orr GA, Verdier-Pinard P, McDaid H, Horwitz SB. Mechanisms of Taxol resistance related to microtubules. *Oncogene* 22, 7280–7295 (2003).
 - **Reviews the different paclitaxel resistance mechanisms in cancer cells.**
 - 22 Smith JA, Wilson L, Azarenko O *et al.* Eribulin binds at microtubule ends to a single site on tubulin to suppress dynamic instability. *Biochemistry* 49, 1331–1337 (2010).
 - 23 McBride A, Butler SK. Eribulin mesylate: a novel halichondrin B analogue for the treatment of metastatic breast cancer. *Am. J. Health Syst. Pharm.* 69, 745–755 (2012).
 - 24 Huang HC, Shi J, Orth JD, Mitchison TJ. Evidence that mitotic exit is a better cancer therapeutic target than spindle assembly. *Cancer Cell* 16, 347–358 (2009).
 - 25 Pampaloni F, Florin EL. Microtubule architecture: inspiration for novel carbon nanotube-based biomimetic materials. *Trends Biotechnol.* 26, 302–310 (2008).
 - 26 Dinu CZ, Bale SS, Zhu G, Dordick JS. Tubulin encapsulation of CNTs into functional hybrid assemblies. *Small* 5, 310–315 (2009).
 - **First publication demonstrating the biomimetic interaction of carbon nanotubes and tubulin polymers *in vitro*.**
 - 27 Dinu CZ, Bale SS, Dordick JS. Kinesin I. ATPase manipulates biohybrids formed from tubulin and carbon nanotubes. *Methods Mol. Biol.* 743, 77–93 (2011).
 - 28 Rodríguez-Fernández L, Valiente R, González J, Villegas JC, Fanarraga ML. Multiwalled carbon nanotubes display microtubule biomimetic properties *in vivo*, enhancing microtubule assembly and stabilization. *ACS Nano* 6, 6614–6625 (2012).
 - **First publication demonstrating the biomimetic interaction of carbon nanotubes and tubulin polymers *in vivo*.**
 - 29 Sargent LM, Hubbs AF, Young SH *et al.* Single-walled carbon nanotube-induced mitotic disruption. *Mutat. Res.* 745, 28–37 (2012).
 - 30 Shams H, Holt BD, Mahboobi SH *et al.* Actin reorganization through dynamic interactions with single-wall carbon nanotubes. *ACS Nano* 8, 188–197 (2014).
 - 31 Gonzalez L, Decordier I, Kirsch-Volders M. Induction of chromosome malsegregation by nanomaterials. *Biochem. Soc. Trans.* 38, 1691–1697 (2010).
 - 32 Sargent LM, Hubbs AF, Young SH *et al.* Single-walled carbon nanotube-induced mitotic disruption. *Mutat. Res.* 745, 28–37 (2012).
 - 33 Li X, Peng Y, Ren J, Qu X. Carboxyl-modified single-walled carbon nanotubes selectively induce human telomeric i-motif formation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 103, 19658–632006 (2006).
 - 34 Lindberg HK, Falck GC, Singh R *et al.* Genotoxicity of short single-wall and multi-wall carbon nanotubes in human bronchial epithelial and mesothelial cells *in vitro*. *Toxicology* 313, 24–37 (2013).
 - 35 Kuang Y, Xu B. Disruption of the dynamics of microtubules and selective inhibition of glioblastoma cells by nanofibers of small hydrophobic molecules. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 52, 6944–6948 (2013).
 - **Shows a similar microtubule cytoskeleton disruption effect with different nanofilaments *in vivo*.**
 - 36 Villegas JC, Álvarez-Montes L, Rodríguez-Fernández L, González J, Valiente R, Fanarraga ML. Multiwalled carbon nanotubes hinder microglia function interfering with cell migration and phagocytosis. *Adv. Healthc. Mater.* 3, 424–432 (2014).
 - 37 Dong C, Kashon ML, Lowry D *et al.* Exposure to carbon nanotubes leads to changes in the cellular biomechanics. *Adv. Healthc. Mater.* 2, 945–951 (2013).
 - 38 Wang J, Xu Y, Yang Z *et al.* Toxicity of carbon nanotubes. *Curr. Drug Metab.* 14, 891–899 (2013).
 - 39 Lanone S, Andujar P, Kermanizadeh A, Boczkowski J. Determinants of carbon nanotube toxicity. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65, 2063–2069 (2013).

Anti-Cancer Cytotoxic Effects of Multiwalled Carbon Nanotubes

Lorena García-Hevia¹, Rafael Valiente², Jesús González³, José Luís Fernández-Luna⁴, Juan C. Villegas⁵ and Mónica L. Fanarraga^{1*}

¹Departments of Biología Molecular, ²Física Aplicada, ³CITIMAC and ⁵Anatomía y Biología Celular, Universidad de Cantabria-IDIVAL and ⁴Unidad de Genética, Hospital Valdecilla-IDIVAL, 39011 Santander, Spain

Abstract: Recent research has opened new alternatives to traditional chemotherapy treatments using nanomaterials as cytotoxic agents. Anti-cancer nanomedicines do not require specific target sites on key proteins or genes to kill cancer cells and have radically different mechanisms to interact with the living matter. Among 1D nanomaterials, multiwalled carbon nanotubes (MWCNTs) have the intrinsic ability to bind tubulin and interfere with microtubule dynamics, mimicking the effect of traditional cytotoxic microtubule-binding agents such as paclitaxel (taxol®). Here, we review the cytotoxic properties of MWCNTs and show a direct pro-apoptotic effect of these nanomaterials *in vitro* in different cancer cell lines and tumor cells obtained from surgical specimens. Understanding the bio-synthetic relationship between MWCNTs and microtubules could serve to improve these nanomaterials to be used as broad spectrum antineoplastic agents in combination to traditional microtubule-binding treatments, thus avoiding drug resistance mechanisms in cancer cells.



Keywords: MWCNTs, tubulin, microtubule dynamics, cell death, chemotherapy.

BRIEF SUMMARY OF THE REVISED SUBJECTS

Multiwalled carbon nanotubes (MWCNTs) share many properties with microtubules. These nanomaterials can enter inside cells where they form mixed biosynthetic polymers with tubulin severely interfering the cell biomechanics, finally triggering cell death in proliferating cells simulating the effect of the traditional microtubule stabilizing drugs. Here we discuss the use of these MWCNTs as potential cytotoxic therapies against cancer.

THE CYTOSKELETON AS A TARGET IN CANCER TREATMENTS

Tubulin and actin are ubiquitous eukaryotic cell soluble proteins that account for over 30% of all the total protein content in some cell types [1]. These proteins assemble two different types of intracellular nanofilaments, the microtubules and the actin microfilaments. These polymers constitute the cellular cytoskeleton and play key functions in cell division, migration, maintenance of cell shape or intracellular trafficking of macromolecules and organelles among others [2]. Both, microtubules and actin are highly dynamic polymers that continuously undergo polymerization/depolymerization processes [3, 4]. Interference with the dynamics of these filaments produces important functional changes in the cell shape and in the cell division process, leading to mitotic spindle aberrations, aneuploidies or multinucleation, often triggering cell death [5, 6]. These reasons make actin and microtubules typical targets of many classical anticancer agents.

Drugs targeting the actin cytoskeleton significantly frustrate cell migration and have shown great promise as anti-proliferative agents *in vitro* [7]. Unfortunately, most actin-targeting drugs have not succeeded preclinical trials due to a plethora of unwanted toxic side effects. The problem being that these chemicals cannot discriminate between the actin cytoskeleton of tumor cells and the actin filaments in muscular healthy cells [8, 9]. On the contrary, microtubules are well validated targets for cancer chemotherapeutic drugs. These protein polymers are naturally occurring intracellular nanotubes of 25 nm diameter that result from the self-assembly of

13 tubulin protofilaments in a twisted cylinder [10]. These polymers result of the head-to-tail alignment of $\alpha\beta$ -tubulin heterodimers that provide the microtubule with an intrinsic polarity (Fig. 1). Microtubules are highly dynamic structures, continuously undergoing polymerization-depolymerization cycles, growing and shrinking on the time scale of seconds [5, 11, 12]. This dynamic behavior, known as microtubule dynamic instability, is crucial during cell division, increasing 20- to 100-fold during mitosis [11, 13]. Some of the most widely used chemotherapeutic cytotoxic treatments, active against a broad range of cancers, are microtubule binding drugs that interfere with microtubule dynamics leading to chromosomal malsegregation, mitotic blockage, and cell death [5, 6].

MICROTUBULE STABILIZING DRUGS AND RESISTANCE TO CHEMOTHERAPY

There are two major types of microtubule dynamic interfering drugs used in cancer. On one hand, molecules that prompt microtubule stabilization, and on the other molecules triggering microtubule depolymerization. These compounds include a broad range of structurally unrelated molecules that typically interact with the β -tubulin polypeptide of the tubulin heterodimer [14-20]. Among the microtubule binding drugs, paclitaxel, also known as taxol®, is the prototypic drug. This chemical compound has been the most widely used cytotoxic anticancer drugs during almost 50 years. Other more modern, mechanistically similar but structurally unrelated chemicals are the epothilones, eleutherobin or discodermolide. These drugs are currently at different developmental stages of preclinical/clinical testing [19, 20]. Specifically, paclitaxel binds a structural pocket into the second globular domain of the β -tubulin polypeptide facing the central hole of the microtubule [21]. Some studies demonstrate that, although the primary target of paclitaxel is the tubulin molecule, its efficacy exceeds that of conventional microtubule-disrupting agents suggesting it could trigger additional cellular effects. Among others, paclitaxel induces programmed cell death in cancer cells by binding and inhibiting the function of protein Bcl-2 (B-cell leukemia 2) triggering apoptosis [22], targeting the protein known as “nuclear receptor subfamily 1 group I member 2” [23], or interacting with the microtubule-associated proteins 2, 4 and tau [24]. Drugs such as the epothilones apparently do not display this paclitaxel-like endotoxin activity [20].

*Address correspondence to this author at the Department of Biología Molecular, Universidad de Cantabria-IDIVAL, 39011 Santander, Spain; E-mail: fanarrag@unican.es

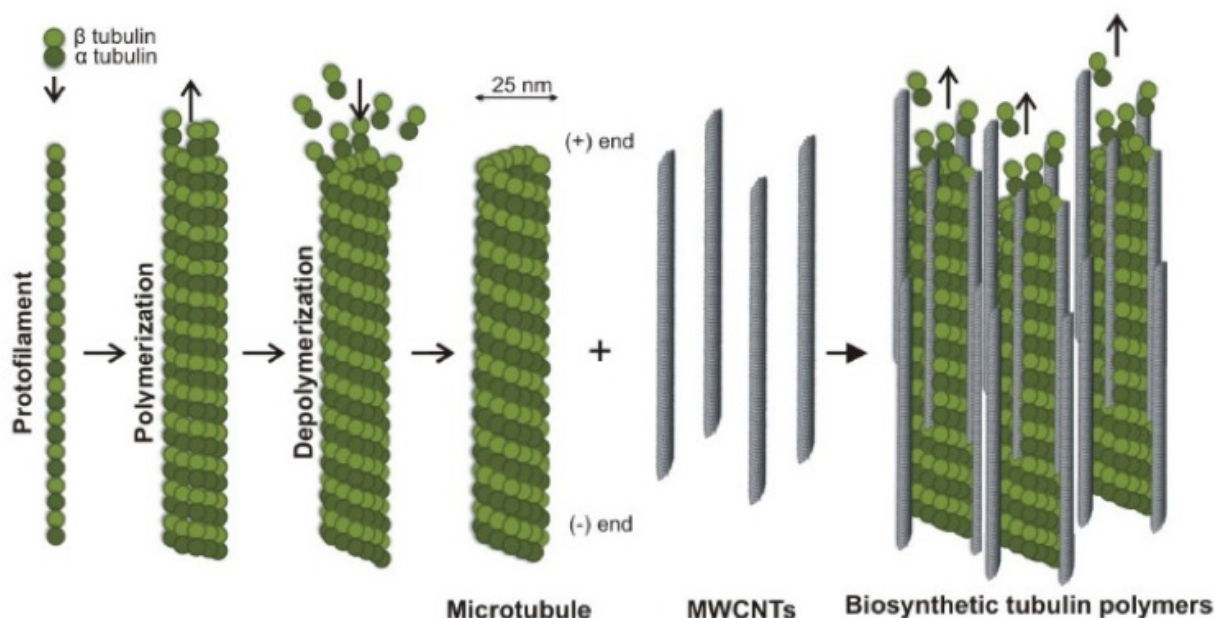


Fig. (1). Biomimetic interaction between tubulin and MWCNTs. Microtubules are tubular polymers assembled of 13 protofilaments constituted of $\alpha\beta$ -tubulin heterodimers aligned in a head-to-tail fashion. This organization confers microtubules an intrinsic polarity. Microtubules are highly dynamic. The polymer extreme ending in β -tubulin, known as the (+) end, is more dynamic than the (-) end displaying α -tubulin. MWCNTs have biomimetic properties with microtubules and can assemble biosynthetic polymers with tubulin interfering with microtubule dynamics.

Unfortunately, tumors frequently evolve resistant to microtubule-binding drugs. Resistance to chemotherapy in general, is a multifactorial process that is fundamentally governed by the principles of Darwinian natural selection. Nature selects for phenotype - not genotype-, and population changes are dictated by local environmental selection forces [25, 26]. The process of carcinogenesis is favored by the genetic instability that is inherent to cancer, and the selection forces that push cells to achieve many different cellular adaptations [25]. In this sense, solid tumors can display thousands of mutations. This fact, accompanied by a highly selective local microenvironment, promotes cancer cell evolution towards resistance. Among the local microenvironmental forces that select the cell population and induce genetic instability there are: (i) hypoxia, (ii) acidosis, or (iii) the reactive oxygen species [26]. Chemotherapy itself, also behaves as a potent environmental selection force, eliminating the non-resistant cells in the tumor, allowing the survival and growth, thus selecting, of cells that bypass the effect of the drug [27-29]. So, malignant cancers are continuously undergoing a reiterative process of clonal expansion after the elimination of the non-resistant cells by repetitive treatments, survival and growth of a few unaffected cells within the tumor mass [27, 28]. These facts ensure the emergence of therapy-resistant populations within the tumor, and make an impossible goal to eradicate cancer with the so called "targeted therapies". These type of selective treatments are generally effective only for a few months before the cancer evolves resistance to the drug.

The use of paclitaxel as chemotherapy is widespread because this drug strikes on key phenotypic features of cancer cells. Paclitaxel targets the microtubule cytoskeleton, interfering with the proliferation and spreading processes of cancer cells. Since, independently of the genetic modifications that drive each malignancy in different cancers, tumor cells characteristically divide, treatments with this drug result in a nonspecific tumor relapse. Unfortunately, tumor cells have also developed mechanisms to resist paclitaxel cytotoxicity [30]. Resistance to microtubule stabilizing agents includes some general resistance mechanisms such as: (i) overexpres-

sion of multidrug glycoprotein transporters, (ii) enhanced drug metabolism, (iii) the activation of a precocious mitotic exit by a mechanism called "mitotic slippage", (iv) or modification of the signaling pathways to promote a weak spindle assembly checkpoint (SAC) and thus, circumventing the cascade of events triggering apoptosis [30, 31]. There are other mechanisms of resistance that operate directly on the microtubule, such as (i) mutations in the binding site of the drug to the β -tubulin molecule, (ii) post-translational modifications to tubulin that inhibit drug binding, (iii) changes in the microtubule-regulatory proteins, or (iv) modifications in the tubulin isotype configuration of these polymers [30]. The development of resistance, together with the general toxicity of these microtubule binding drugs urge the discovery of new therapies against cancer.

OVERCOMING TUMOR DRUG RESISTANCE USING CNTs

Nanotechnology promises radically new alternatives to traditional chemotherapy. The use of nanomaterials in medicine has the potential to completely transform the anti-neoplastic treatments [32-40]. Nanomaterials are elements of different chemical compositions, nature and morphologies that are typically characterized by their dimensions in the range of nanometers (10^{-9} m). The small size allows them to enter into the cells by different mechanisms, to interact with cellular nano-components, and to interfere with many biological processes that also occur at the nano-scale. Nanomaterials can also be functionalized with different molecules so they are tailored to interact specifically with target tumor cells. Moreover, nanomedicines display unique strategies to kill cells, for instance, they can be overheated by alternating magnetic fields or intense radiation from a laser beam, and they do not require target interaction sites on particular proteins that might be subject of mutations. As a result, nanomaterials have opened up new horizons in the field of chemotherapy.

Nanomaterials in general, display unexpected properties compared to the bulk material. Indeed a single element such as carbon

can assemble various structurally different nanostructures such as fullerenes, graphene, nanodiamonds or carbon nanotubes (CNTs), all presenting different physico-chemical properties and biological effects. While the first three nanomaterials are apparently biocompatible [32, 41], CNTs have been reported to produce numerous unwanted toxic side-effects in cells and tissues [42-55]. But CNTs also display very interesting physicochemical properties applicable in biotechnology [56, 57] and have recently emerged as ideal candidates for many "BIO" applications such as bioimaging, biosensing, or biomedicine [40, 58-62]. These filaments are well documented to interact with the biological matter and to penetrate inside tissues and cells where they intermingle with many of the intracellular structures [63-67]. Once in the cytoplasm, CNTs have been reported to interact with most cellular nanofilaments such as DNA [49-50], actin microfilaments [68-70] and microtubules [71-74], triggering different biological responses [42-55]. There are studies demonstrating how the different morphological or physical characteristics of CNTs -i.e. size, surface reactivity or rigidity- are fundamental for their *in vitro* and *in vivo* bioactivity [75-77]. Indeed, the huge variety of CNTs in terms of length, widths, purity, or the number of walls, might explain the many different biological effects reported for these filaments.

A key factor to take into account that is crucial in terms of the biological effect, is the vehicle -or excipient- in which CNTs are resuspended when they are exposed to live cells or tissues. As a rule, well dispersed CNTs are likely to interact with the surface of cells in different ways, being translocated into the cytoplasm of most cell types [63, 66]. On the contrary, aggregated or poorly resuspended nanomaterials behave more like bulk material, being only phagocytized by cells of the reticulo-endothelial system. In particular, poorly functionalized CNTs aggregate into large,

micrometric bundles that are phagocytized and accumulate intracellularly in macrophages, often killing these cells by the generation of reactive oxygen species that lead to oxidative stress [52, 54, 55, 69, 78-83, 89-90].

Among the existing varieties of CNTs, multiwalled CNTs (MWCNTs) have intrinsic biomimetic properties that prompt their interaction with tubulin, assembling biosynthetic polymers both, *in vitro* [71-73] and *in vivo* [72, 84]. The hypothesis is that microtubules and MWCNTs share many features such as their dimensions, a high resiliency and high surface reactivity that favors the assembly of mixed tubulin-MWCNTs polymers [75-78]. This association produces a scaffolding effect of the MWCNTs on the tubulin protofilaments that stabilizes the microtubules, supporting and increasing tubulin polymerization into these bio-hybrid assemblies (Fig. 1) [72, 73]. When this interaction occurs intracellularly, it leads to microtubule cytoskeletal stability triggering significant changes in the biomechanics of the cell [85]. These changes typically lead to aberrant mitotic spindle formation, chromosome malsegregation, and eventually programmed cell death or senescence [45-47, 72]. This cytotoxic mechanism of action mimics that of traditional microtubule-stabilizing drugs such as paclitaxel. As for traditional chemotherapy, the dosage of MWCNTs determines if a cells undergoes (i) mitotic arrest, SAC activation and cell death, (ii) mitotic catastrophe and cell death, (iii) unequal cell division (aneuploidy), or (iv) mitotic slippage often leading to senescence, apoptosis, or adaptation and survival (Fig. 2) [72].

In terms of cancer cell cytotoxicity, there are several advantages of the use of MWCNTs compared to conventional drugs. First, these nanomaterials do not require specific molecular target binding sites on the tubulin molecule to produce a microtubule stabilization

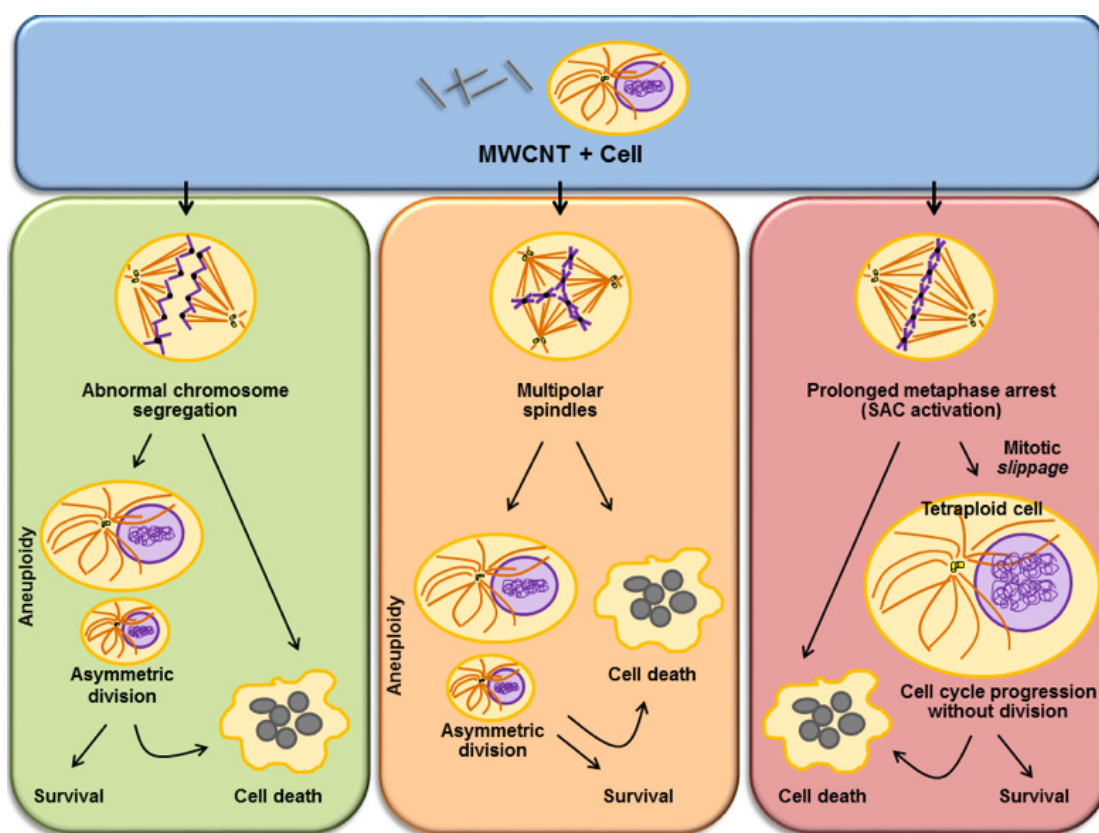


Fig. (2). MWCNTs effect in proliferation cancer cells. Tumor cells display many different strategies to escape the effect of microtubule stabilizing agents. MWCNT-treatment mimics the effect of microtubule stabilizing drugs, triggering mitotic spindle aberrations, leading to aneuploidies that finally produce cell death, or survival followed by senescence.

effect [74]. Various *in vitro* and *in vivo* studies show different images of MWCNT-tubulin bio-hybrid suggesting these carbon fibers interact along the surface of the protofilaments of microtubules, forming mixed bundles [72, 73]. Second, general drug resistance mechanisms, such as enhancing drug metabolism or overexpression of membrane drug transporters, are not likely to disable the action of MWCNTs. And finally, cell artifices such as triggering a precocious mitotic exit by mitotic slippage or by promoting a weak SAC, would only produce a transitory cytotoxic relief effect until the new biosynthetic MWCNT-tubulin cytoskeletal network attempts to rearrange into a fully functional radially organized interphase cytoskeleton, significantly retarding -or even blocking- mitotic exit, finally killing the cell. Interestingly, recent studies demonstrate that blocking mitotic exit might be the best therapeutic strategy to destroy cancer cells, as an alternative to perturbing spindle assembly during mitosis [86].

Apart from their intrinsic biomimetic properties, CNTs have other anti-cancer properties. These carbon filaments can also produce heat when they are excited with infrared light, and this effect can be activated when CNTs are inside cells or tumors, simply by illumination with a laser in the infrared range (900-1100 nm), thus killing cancer cells by hyperthermia from inside-out. These wavelengths easily penetrate biological tissues producing inappreciable cell damage, and are not mutagenic such as the ultraviolet radiation, while producing heat and rising the intracellular temperature [87, 88]. This remarkably interesting effect which is currently being explored by many groups, is known as nano-photothermolysis. There are also preliminary studies that use CNTs as “nanocapsules” for delivering drugs, nucleic acids or radioactive compounds inside cells [38, 39]. In summary, CNTs represent a promising future in cancer treatment providing radically new alternatives that are quite likely to circumvent most drug resistance mechanisms to destroy multi-drug resistant cells.

MWCNTs ARE INTRINSICALLY CYTOTOXIC IN A VARIETY OF CANCER CELLS

There are many reports in the literature claiming that CNTs display a cytotoxic effect [42-44, 51, 52, 72, 75, 76, 79, 81, 82, 89-93]. In particular, MWCNTs promote the death of human epithelial cells [42, 52, 54, 76, 72], human lymphocytes [43, 51], human macrophages [44], human connective tissues [75], human cancer cell lines [89-92], as well as many animal cell lines. Interestingly, there is also literature claiming the contrary [94-99]. This controversy illustrates the huge variability of existing CNTs in terms of lengths, diameters, surface functionalization, contaminants, etc., as well as the diverse nature of the cells used for the different *in vitro* toxicological assays performed. For instance, many studies have been done at much higher doses than those reasonable. But even at tolerable dosages, it is difficult to precisely quantify the actual amount of well dispersed CNTs available in the culture medium, and the proportion of CNTs that actually translocate into each cell. As formerly mentioned, dispersion of CNTs in saline solutions - such as culture media- is not a trivial matter and can significantly influence the amount of functionalized nanomaterials that get in contact with the plasma membrane of the growing cells.

Various studies show how CNTs do not penetrate inside cells mechanically, i.e. piercing the cell membrane. Instead they are actively translocated through the plasma membrane [63-65]. Once in the cell, CNTs can produce different cytotoxic effects depending on the affinity they have for the different intracellular naturally-occurring nanofilaments. For example, single-walled CNTs have been reported to destroy the DNA double helix, producing lethal clastogenic effects [43-50]. These nanofilaments also interact with the actin microfilaments reorganizing actin and producing severe abnormalities such as multinucleation in different dividing cells [68, 70]. On the other hand, MWCNTs have been claimed to preferably interact with tubulin or actin [69, 72-74] triggering cell death

and cytotoxicity by different mechanisms *in vitro* [42, 44, 51, 75, 76, 79, 82, 83, 89, 91-93] and *in vivo* [75, 76, 100, 101].

CNT *in vitro* cytotoxicity has been reported for various cancer cell lines, including a human breast adenocarcinoma cell line (MCF7) [89], human hepatocarcinoma [90], human astrocytoma and lung carcinoma [91], human neuroblastoma cells [92] or the C6 rat glioma cells [93]. In this review we wish to supplement previously published studies with additional results performed *in vitro*. Here we report the effect of fully functionalized MWCNTs on three samples of human cancer cells to evaluate the intrinsic cytotoxic effects of MWCNTs, discarding possible methodological artifacts, such as the use of different *in vitro* or *in vivo* systems, or different functionalization methods. For the study we have used MWCNTs synthesized following the catalytic chemical vapor deposition method (Supplementary Material). Briefly, MWCNTs were prepared free of contaminants by repeated wash in aqueous HCl solutions. CNTs were next filtered and pH equilibrated until neutrality. The full characterization of the *as prepared* MWCNTs by transmission electron microscopy, atomic force microscopy Raman spectroscopy and thermo-gravimetric analyses can be found in previous works [72, 84]. Raman spectroscopy characterization of the pristine MWCNTs shows resonances, such as the dispersive disorder induced D band at 1330 cm^{-1} , the tangential G band at 1586 cm^{-1} , and the D' band at 1614 cm^{-1} [102-103]. Electron microscopy characterization reveals that the MWCNTs used displayed a variable number of walls, from 3 to 12, with outer diameters ranging from 5 to 15 nm and inner diameters between 2.5 and 10 nm respectively (for details see Supplementary Figures). Most of the MWCNTs displayed an open-end configuration, although occasional closed ends were also observed in approximately 10% of the MWCNT extremes. The absence of undesired impurities on the surface of the MWCNTs was confirmed by all these techniques. For the study we prepared a stable dispersion of MWCNTs in bovine serum. Serum proteins and lipids interact with the surface of the CNTs significantly improving dispersion in saline solutions such as culture medium [72, 104, 105]. A stock resuspension of 0.2 mg mL^{-1} of MWCNTs in culture medium containing 30% serum was obtained after repeated cycles of vortex mixing followed by mild sonication (cycles of 2 s for 5 times, frequency of 38 kHz) [72, 84]. The existing aggregates were eliminated by centrifugation (10 min at $13,000\text{ r. p. m.}$ on a bench top centrifuge). The complete dispersion and stability of the resuspension of MWCNTs was guaranteed collecting the supernatant of the dispersion after 5 min centrifugation at $10,000 \times g$. The final concentration of MWCNTs in the medium was estimated on the basis of a calibration curve following measurements of absorbance at 540 nm [72]. The obtained MWCNT stock dispersion was re-diluted in the culture medium to obtain a final $20\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ working dilution.

HeLa cells were used to perform the study as a startup model since this cell line is well-characterized and it is a homogeneous system compared with most tumor-derived cell lines. In addition, HeLa cells have been previously shown to internalize MWCNTs at this working dose ($20\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$) and incubation times (70 h), displaying clear anti-proliferative and pro-apoptotic effects [72]. These experiments show how when these cells are exposed to MWCNTs in the culture medium, they undergo a massive cell retraction and detachment from the culture substrate noticeable during the first 70 h of exposure (Fig. 3). This morphological change is indicative of a cytotoxic effect of MWCNTs that is associated with a 6% rise in apoptosis by flow cytometry (Fig. 3, brown, sub-G1 fraction). Cytotoxicity is also accompanied by a patent blockage in the “S” phase of the cell cycle, suggesting MWCNTs also interfere with DNA replication (Fig. 3, yellow).

These results are now compared with the effect of MWCNTs on two different neural derived cancer cell lines (U87 MG glioblastoma cells and neuroblastoma SH-SY 5Y cells) as well as cells isolated in our laboratories from surgical specimens of glioblastoma

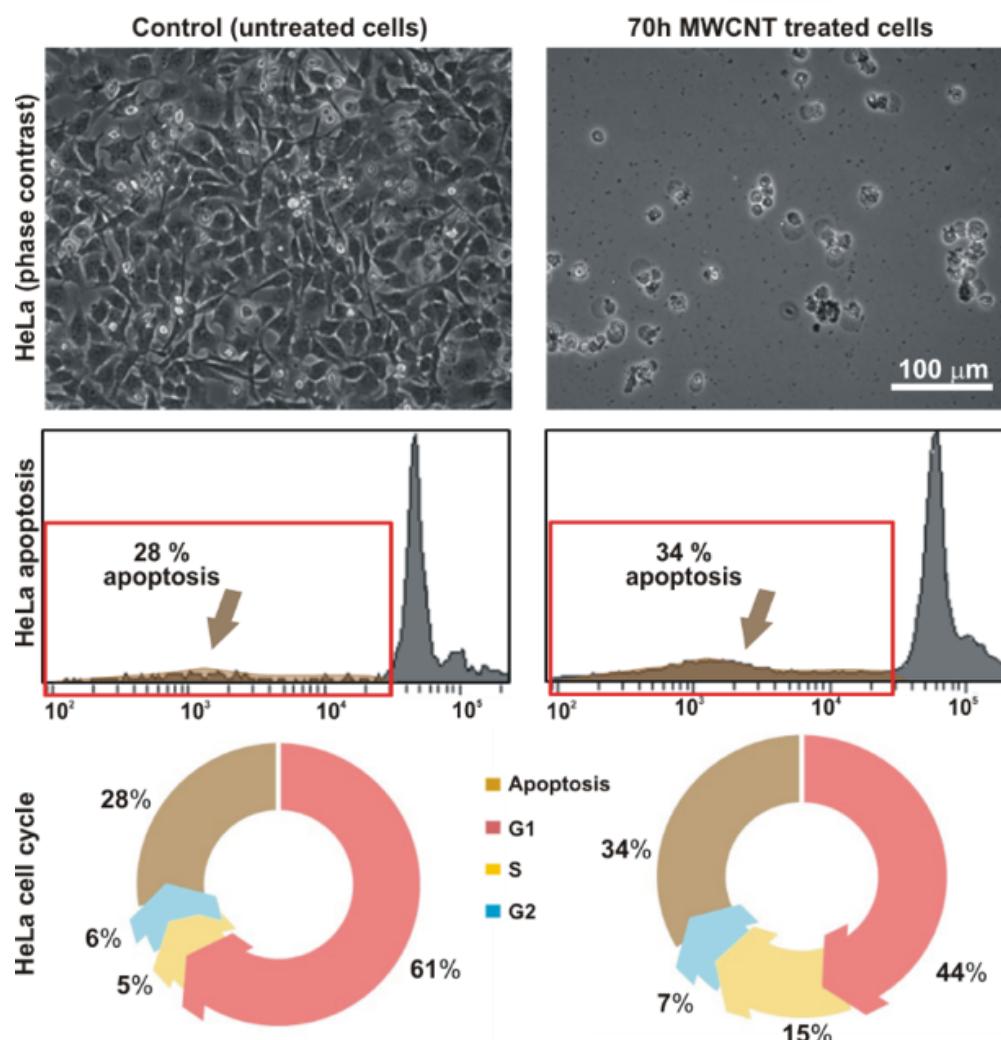


Fig. (3). MWCNTs Cytotoxic effect on HeLa cells. (Top) Phase contrast image of control HeLa cells (untreated) and MWCNT-treated cells ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$ for 70 h). As previously reported, MWCNTs produce patent signs of cytotoxicity in HeLa cells [72]. (Middle) Flow cytometry logarithmic plots of the same HeLa cell populations. A rise on the percentage of cells displaying fragmented DNA (Sub-G1 fraction) characteristic of apoptosis is indicated in brown (arrow, red boxes). (Bottom) Charts displaying the proportions of HeLa cells at different stages of the mitotic cycle and apoptosis in controls and 70 h MWCNT-treated HeLa cell cultures and controls, as determined by flow cytometry. MWCNT-treatment results in a drop in the percentages of cells at the G1 stage (non-dividing cells, represented in red color), a rise of cells at S-G2 (dividing cells, yellow/blue), and a higher rate of apoptosis (6% rise, brown). Changes in the cell cycle are indicative of an anti-proliferative effect on MWCNTs in HeLa.

multiforme tumors. All these cells derive from human metastatic tumors of neuroepithelial origin. The SH-SY 5Y cell line originally grew from a metastasis of neural origin found in a bone marrow biopsy. These cells typically display 47 chromosomes and form tumors in nude mice in approximately 3–4 weeks after transplantation [106]. In the presence of various chemical agents, SH-SY 5Y cells can still differentiate into functionally mature neurons, and upon differentiation, these cells stop proliferating maintaining a constant cell number and displaying a *quasi*-normal phenotype with dopamine- β -hydroxylase activity, converting glutamate to the neurotransmitter GABA. The U87 MG cell line derived from a grade IV glioblastoma (astrocytoma) tumor. Glioblastomas account for more than 40% of all intracranial human tumors and represent some of the most common, aggressive and malignant primary brain glial cell-derived cancers in adults. U87 MG glioblastoma cells are highly heterogeneous and are typically hypodiploid cells (aneuploidies where cells carry 45 chromosomes or less). These cells also produce solid tumors upon transplantation in immunodeficient mice [107].

In addition to cell lines, we have also investigated the effect of MWCNTs on human glioblastoma multiforme explant-derived cells obtained from chemotherapy untreated patients. These surgical specimen-derived cells are an interesting model because they are not standard cancer cell line models, and thus represent a closer version of the inherent tumor heterogeneity. The phenotypic characteristics of these cultures have been fully described previously [108]. These cells can also form solid tumors when injected as xenografts into the chicken embryo limb or the mouse brain cortex.

Generalizing and based on their phenotype, one would expect a growing degree of malignancy in these cell varieties, being the SH-SY 5Y neuroblastoma cells the most benign of all these cancer cells. Cells such as the U87 MG cell line model or the explant-derived glioblastoma multiforme cultures are genetically much more heterogeneous and would be expected to display sophisticated resistance mechanisms to the cytotoxic effects of chemotherapy.

Our results, summarized in the flow cytometry charts shown in Fig. 4, demonstrate the effect of the exposure to $20 \mu\text{g mL}^{-1}$

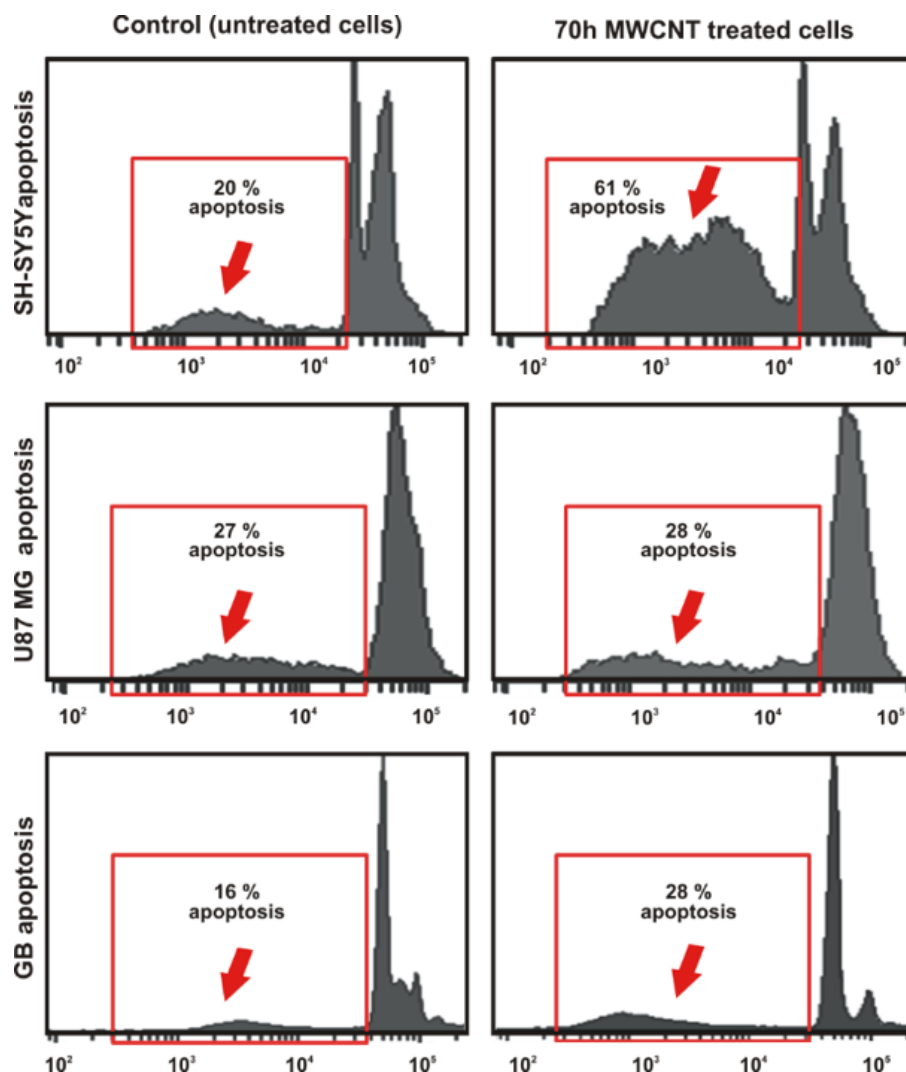


Fig. (4). Pro-apoptotic effect of MWCNTs on different human cancer cells of neural origin. Logarithmic flow cytometry chart displaying the sub-G1 fraction of SH-SY 5Y neuroblastoma cells, U87 MG glioblastoma multiforme cells and human surgical specimen-derived glioblastoma multiforme cells (GB), all treated with $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ MWCNTs in the culture medium during 70 h. The red box indicates the sub-G1 peak (apoptotic cells), cells displaying fragmented DNA typical of apoptosis.

MWCNTs in the culture medium of these cell models. This amount of MWCNTs produces a significant cytotoxic effect in the neuroblastoma SH-SY 5Y cells (over 40% rise in apoptosis after 70 h exposure; Fig. 4, arrows) while in the U87 MG cell line, the same treatment conditions produced an almost insignificant effect. Interestingly, in the surgical specimen derived glioblastoma multiforme cells (Fig. 4, GB), MWCNT treatment produced a rise in cell death of approximately 14% after 70 h treatment.

Metaphase chromosomes as well as apoptotic bodies, and more particularly DNA fragmentation and compaction that are typical of programmed cell death, can also be monitored by confocal fluorescent microscopy using DNA labelling agents such as Hoescht, also known as Bis-benzimide. In Fig. 5 we show SH-SY 5Y neuroblastoma cells (top), U87 MG cells (middle panel) and finally, explant-derived glioblastoma multiforme cultures (GB, bottom) stained with Hoescht (blue channel) and phalloidin-tetramethylrhodamine B isothiocyanate (red channel) highlighting the cell cortex. As determined by flow cytometry (second peak in the flow chart), untreated (control) SH-SY 5Y neuroblastoma cell cultures display a high cell division rate presenting many cells typically in metaphase (empty white arrows). MWCNT-treated SH-SY 5Y neuroblastoma

cultures on the other hand, display many cells exhibiting compacted DNA spots indicative of apoptotic cell death 70 h after treatment (solid white arrows).

Several mitotic figures are also observed in the untreated U87 MG glioblastoma cell culture (Fig. 5, empty white arrows). Interestingly, the degree of aberrant nuclear patterns observed (yellow empty arrows) and presence of occasional apoptotic bodies in these cultures (solid white arrows), also inferred by the flow cytometry data, are indicative of the high degree of genomic instability typical of malignant cell lines. In this case, treatment of U87 MG cells with MWCNTs increased the number of detectable apoptotic bodies (solid white arrows) and the proportion of multinucleated cells (yellow empty arrows) presumably as a consequence of the interference of MWCNT with the mitotic spindle dynamics during mitosis. Apoptosis was neither obvious in explant derived glioblastoma multiforme (GB) cells treated with MWCNTs (solid white arrows). However, the smaller cell colony sizes and significant reduction in the mitotic figures suggest that the presence of MWCNTs in the cell culture medium hindered cell proliferation. Apoptotic bodies indicative of cell death were also observed in MWCNT-treated glioblastoma cells (solid white arrow).

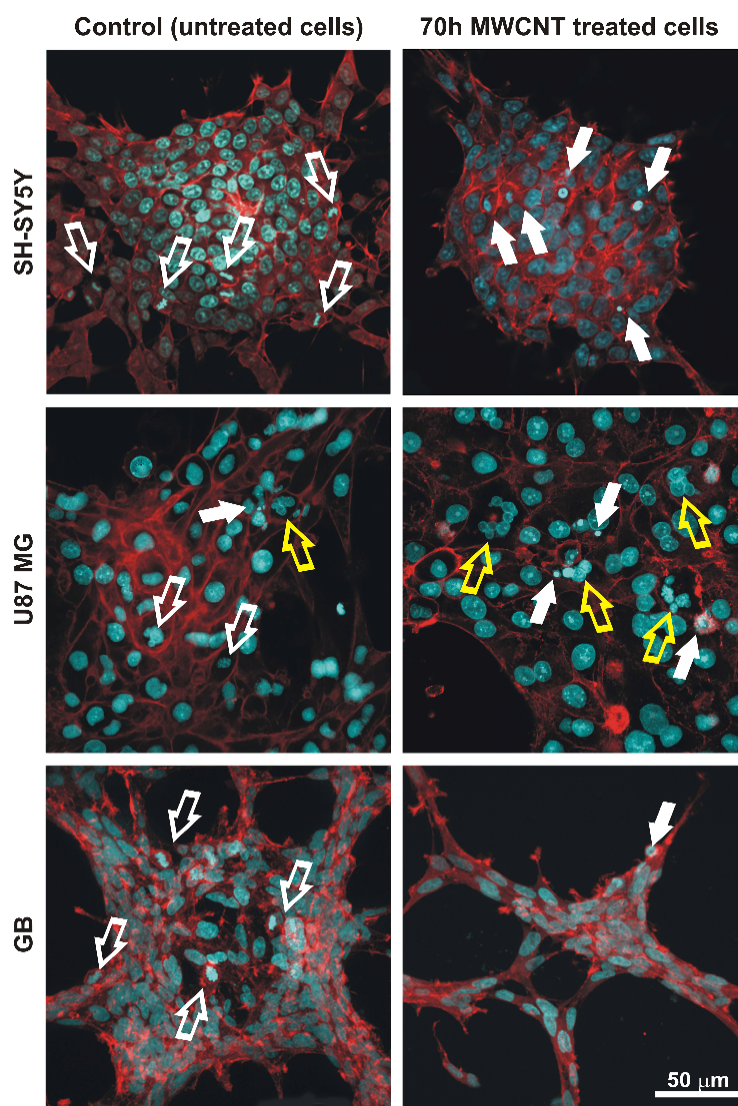


Fig. (5). Identification of apoptosis *in situ* in different human neuroepithelial cancer cells. Confocal microscopy images of human cancer cells of neural origins untreated (left) and treated (right) with $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ MWCNTs. Cells are stained with Hoechst (blue channel) to stain the nuclear and chromosomal DNA and rhodamine phalloidin (red channel) highlighting the cell cortex. Images of mitotic chromosomes (empty white arrows) are often observed in untreated cells, while apoptotic bodies resulting of DNA fragmentation and compaction (filled white arrows) are significantly increased in MWCNT-treated cells. Empty yellow arrows point at multinucleated cells, more abundant in the U87 MG glioblastoma cell line. The scale bar ($50 \mu\text{m}$) is common for all figures.

CONCLUSION

CNTs have been long blamed for being nasty to health. Their dimensions, composition, physicochemical properties and surface properties make of these carbon filaments potential toxic harms. However, many of the current therapies have evolved from the controlled use of different poisons. The most illustrative example is paclitaxel (taxol®). This drug is one of the most widely used chemotherapeutic drug ever discovered, effective against a broad range of malignancies such as lung, ovarian or breast cancers. Yet, still one of the major limitations of taxol® is its toxicity. Paclitaxel excess can produce fatal poisoning [109, 110], but even the adequate use, taxol® has a numerous side effects including: low blood counts, immunosuppression, hair loss, arthralgias and myalgias, peripheral neuropathies, nausea and vomiting, diarrhea, evidence of low fertility and fetotoxicity and abortions, among others. Despite these systemic toxic effects, paclitaxel is fully approved by the FDA and EMA for its use in many different types of tumors with different degrees of success.

MWCNTs have also been associated with aneuploidies and genomic instability *in vitro* and toxicity in general. However, these handicaps could be bypassed in the nearest future by (i) bio-functionalization an efficient targeting of MWCNTs into the tumor, (ii) bio-compatibilization of these nanofilaments improving their biodegradation, and finally, (iii) increasing their elimination from the organism. So, despite there is still much work to be carried out before nanomaterials can be used as ordinary anti-tumoral nanomedicines, many promising results have created big expectations of their use as neoadjuvant or adjuvant therapies against cancer in combination to microtubule targeting drugs.

ABBREVIATION

CNTs	=	Carbon nanotubes
MWCNTs	=	Multiwalled carbon nanotubes
SAC	=	Spindle assembly checkpoint
FDA	=	U S Food and Drug Administration

EMA = European Medicines Agency

CONFLICT OF INTEREST

The authors confirm that this article content has no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Ms M. Aramburu for her assistance in the cytometry, and to the Nikon A1R Laser Microscopy Unit of the IDIVAL Institute for the confocal microscopy imaging. This work has been supported by the Spanish MINECO Project Refs. PI13/01074 (AES 2013), MAT2012-38664-C02-01, RD12/0036/0022, Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer (RTICC-ISCI) and private funding from "Fundación Eugenio Rodríguez Pascual" (Ayudas a la Investigación Biomédica 2013).

SUPPORTIVE/SUPPLEMENTARY MATERIAL

Includes: Experimental Section (MWCNTs characterization, functionalization and dispersion; Flow Cytometry; Cell staining and Confocal Microscopy Imaging) and Supplementary Figures (Fig. S1, Fig. S2)

REFERENCES

- [1] Eaton SL, Roche SL, Llaverro-Hurtado M, et al. Total protein analysis as a reliable loading control for quantitative fluorescent Western blotting. *PLoS One* 2013; 8: e72457.
- [2] Fletcher DA, Mullins D. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature* 2010; 463: 485-92.
- [3] Mitchison T, Kirschner M. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 1984; 312: 237-42.
- [4] Pollard TD, Borisy GG. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 2003; 112: 453-65.
- [5] Jordan MA, Wilson L. Microtubules and actin filaments: dynamic targets for cancer chemotherapy. *Curr Opin Cell Biol* 1998; 1: 123-30.
- [6] Zhou J, Giannakakou P. Targeting microtubules for cancer chemotherapy. *Curr Med Chem Anti-Cancer Agents* 2005; 5: 65-71.
- [7] Bousquet PF, Paulsen LA, Fondy C, Lipski KM, Loucy KJ, Fondy TP. Effects of cytochalasin B in culture and *in vivo* on murine Madison 109 lung carcinoma and on B16 melanoma. *Cancer Res* 1990; 50: 1431-9.
- [8] Senderowicz AM, Kaur G, Sainz E, et al. Jasplakinolide's inhibition of the growth of prostate carcinoma cells *in vitro* with disruption of the actin cytoskeleton. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 46-51.
- [9] Bonello TT, Stehn JR, Gunning PW. New approaches to targeting the actin cytoskeleton for chemotherapy. *Future Med Chem* 2009; 1: 1311-31.
- [10] Nogales E. Structural insights into microtubule function. *Annu Rev Biochem* 2000; 69: 277-302.
- [11] Mitchison T, Kirschner M. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 1984; 312: 237-42.
- [12] Desai A and Mitchison TJ. Microtubule polymerization dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1997; 13: 83-117.
- [13] Sharp DJ, Rogers GC and Scholey JM. Microtubule motors in mitosis. *Nature* 2000; 407: 41-7.
- [14] Chen J, Liu T, Dong X, Hu Y. Recent development and SAR analysis of colchicine binding site inhibitors. *Mini Rev Med Chem* 2009; 9: 1174-90.
- [15] Gidding CE, Kellie SJ, Kamps WA, de Graaf SS. Vincristine revisited. *Crit Rev Oncol Hematol* 1999; 29: 267-87.
- [16] De Brabander M, Geuens G, Nuydens R, Willebrords R, De Mey J. Taxol induces the assembly of free microtubules in living cells and blocks the organizing capacity of the centrosomes and kinetochores. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 5608-12.
- [17] Kowalski RJ, Giannakakou P, Hamel E. Activities of the microtubule-stabilizing agents epothilones A and B with purified tubulin and in cells resistant to paclitaxel (Taxol®). *J Biol Chem* 1997; 272: 2534-41.
- [18] Amos LA, Löwe J. How Taxol stabilises microtubule structure. *Chem Biol* 1999; 6: R65-9.
- [19] Alberti C. Taxane- and epothilone-based chemotherapy: from molecule cargo cytoskeletal logistics to management of castration-resistant prostate carcinoma. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2013; 17: 1658-64.
- [20] Muhlrad PF, Sasse F. Epothilone B stabilizes microtubuli of macrophages like taxol without showing taxol-like endotoxin activity. *Cancer Res* 1997; 57: 3344-6.
- [21] Fang G, Chang BS, Kim CN, Perkins C, Thompson CB, Bhalla KN. "Loop" domain is necessary for taxol-induced mobility shift and phosphorylation of Bcl-2 as well as for inhibiting taxol-induced cytosolic accumulation of cytochrome c and apoptosis. *Cancer Res* 1998; 58: 3202-8.
- [22] Rodi DJ, Janes RW, Sanganee HJ, Holton RA, Wallace BA, Makowski L. Screening of a library of phage-displayed peptides identifies human Bcl-2 as a taxol-binding protein. *J Mol Biol* 1999; 285: 197-203.
- [23] Harmsen S, Meijerman I, Beijnen JH, Schellens JH. Nuclear receptor mediated induction of cytochrome P450 3A4 by anticancer drugs: a key role for the pregnane X receptor. *Cancer Chemother Pharmacol* 2009; 64: 35-43.
- [24] McGrogan BT, Gilmartin B, Carney DN, McCann A. Taxanes, microtubules and chemoresistant breast cancer. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1785: 96-132.
- [25] Goymer P. Natural selection: The evolution of cancer. *Nature* 2008; 454: 1046-8.
- [26] Gatenby R. Perspective: Finding cancer's first principles. *Nature* 2012; 491: S55.
- [27] Navin N, Kendall J, Troge J, et al. Tumour evolution inferred by single-cell sequencing. *Nature* 2011; 472: 90-4.
- [28] Greaves M, Maley CC. Clonal evolution in cancer. *Nature* 2012; 481: 306-13.
- [29] Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA Jr, Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *Science* 2013; 339: 1546-58.
- [30] Orr GA, Verdier-Pinard P, McDaid H, Horwitz SB. Mechanisms of Taxol resistance related to microtubules. *Oncogene* 2003; 22: 7280-95.
- [31] Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 48-58.
- [32] Chen Z, Ma L, Liu Y, Chen C. Applications of functionalized fullerenes in tumor theranostics. *Theranostics* 2012; 2: 238-50.
- [33] Schroeder A, Heller DA, Winslow MM, et al. Treating metastatic cancer with nanotechnology. *Nat Rev Cancer* 2012; 12: 39-50.
- [34] (Editorial) Cancer nanotechnology: Small, but heading for the big time. *Nat Rev Drug Discov* 2007; 6: 174-5.
- [35] Farokhzad OC, Cheng J, Teply BA, et al. Targeted nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy *in vivo*. *PNAS USA* 2006; 103: 6315-20.
- [36] Sailor MJ, Park JH. Hybrid nanoparticles for detection and treatment of cancer. *Adv Mater* 2012; 24: 3779-802.
- [37] Dobson, J. Cancer therapy: Death by magnetism. *Nat Mat* 2012; 11: 1006-8.
- [38] Bourzac, K. Nanotechnology: Carrying drugs. *Nature* 2012; 491: S58-60.
- [39] Bae KH, Chung HJ, Park TG. Nanomaterials for cancer therapy and imaging. *Mol Cells* 2011; 4: 295-302.
- [40] Madani SY, Naderi N, Dissanayake O, Tan A, Seifalian AM. A new era of cancer treatment: carbon nanotubes as drug delivery tools. *Int J Nanomed* 2011; 6: 2963-79.
- [41] Yang K, Zhang S, Zhang G, Lee ST, Liu Z. Graphene in mice: ultrahigh *in vivo* tumor uptake and efficient photothermal therapy. *NanoLett* 2010; 10: 3318-23.
- [42] Muller J, Decordier I, Hoet PH, et al. Clastogenic and aneugenic effects of multi-wall CNTs in epithelial cells. *Carcinogenesis* 2008; 29: 427-433.
- [43] Cveticanin J, Joksic G, Leskovic A, Petrovic S, Sobot AV, Neskovic O. Using carbon nanotubes to induce micronuclei and double strand breaks of the DNA in human cells. *Nanotechnology* 2010; 21: 015102.
- [44] Di Giorgio ML, Di Bucchianico S, Ragnelli AM, Aimola P, Santucci S, Poma A. Effects of single and multiwalled CNTs on macrophages: Cyto and genotoxicity and electron microscopy. *Mutat Res* 2011; 722: 20-31.
- [45] Sargent LM, Shvedova AA, Hubbs AF, et al. Induction of aneuploidy by single-walled carbon nanotubes. *Environ Mol Mutagen* 2009; 50: 708-17.

- [46] Sargent LM, Hubbs AF, Young SH, *et al.* Single-walled carbon nanotube-induced mitotic disruption. *Mutat Res* 2012; 745: 28-37.
- [47] Gonzalez L, Decordier I, Kirsch-Volders M. Induction of chromosome malsegregation by nanomaterials. *Biochem Soc Trans* 2010; 38: 1691-7.
- [48] Kisin ER, Murray AR, Sargent L, *et al.* Genotoxicity of carbon nanofibers: are they potentially more or less dangerous than CNTs or asbestos?. *Toxicol Appl Pharmacol* 2011; 252: 1-10.
- [49] Li X, Peng Y, Qu X. Carbon nanotubes selective destabilization of duplex and triplex DNA and inducing B-A transition in solution. *Nucleic Acids Res* 2006; 34: 3670-6.
- [50] Li X, Peng Y, Ren J, Qu X. Carboxyl-modified single-walled CNTs selectively induce human telomeric-motif formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 19658-63.
- [51] Bottini M, Bruckner S, Nika K. Multiwalled carbon nanotubes induced T lymphocyte apoptosis. *Toxicol Lett* 2006; 160: 121-6.
- [52] Pulskamp K, Diabaté S. CNTs show no sign of acute toxicity but induce intracellular reactive oxygen species in dependence on contaminant. *Toxicol Lett* 2007; 168: 58-74.
- [53] Madani SY, Mandel A, Seifalian AM. A concise review of carbon nanotube's toxicology. *Nano Rev* 2013; 4.
- [54] Bhattacharya K, Andón FT, El-Sayed R, Fadeel B. Mechanisms of carbon nanotube-induced toxicity: Focus on pulmonary inflammation. *Adv Drug Deliv Rev* 2013; 65: 2087-97.
- [55] Poland CA, Duffin R, Kinloch I, Maynard A. Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. *Nat Nanotechnol* 2008; 3: 423-8.
- [56] Schnorr J M, Swager TM. Emerging application of carbon nanotubes. *Chem Mater* 2011; 23: 646-57.
- [57] De Volder MF, Tawfick SH, Baughman RH, Hart AJ. Carbon nanotubes: Present and future commercial applications. *Science* 2013; 1: 535-9.
- [58] Mundra RV, Wu X, Sauer J, Dordick JS, Kane RS. Nanotubes in biological applications. *Curr Opin Biotechnol* 2014; 28: 25-32.
- [59] Saito N, Haniu H, Usui Y, *et al.* Safe clinical use of carbon nanotubes as innovative biomaterials. *Chem Rev* 2014; 114: 6040-79.
- [60] Marchesan S, Prato M. Nanomaterials for (Nano)medicine. *ACS Med Chem Lett* 2013; 4: 147-9.
- [61] Fadeel B, Feliu N, Vogt NC, Abdelmonem AM, Parak WJ. Bridge over troubled waters: Understanding the synthetic and biological identities of engineered nanomaterials. *WIREs Nanomed Nanobiotechnol* 2013; 5: 111-29.
- [62] Etheridge ML, Campbell SA, Erdman AG, Haynes CL, Wolf SM, McCullough J. The big picture on nanomedicine: the state of investigational and approved nanomedicine products. *Nanomed* 2013; 9: 1-14.
- [63] Shi X, Von demBussche A, Hurt RH, Kane AB, Gao H. Cell entry of one-dimensional nanomaterials occurs by tip recognition and rotation. *Nat Nanotechnol* 2011; 6: 714-9.
- [64] Lacerda L, Russier J, Pastorin G, *et al.* Translocation mechanisms of chemically functionalised carbon nanotubes across plasma membranes. *Biomaterials* 2012; 33: 3334-43.
- [65] Porter AE, Gass M, Muller K, Skepper JN, Midgley PA, Welland M. Direct imaging of single-walled CNTs in cells. *Nat Nanotechnol* 2007; 2: 713-7.
- [66] Yehia HN, Draper RK, Mikoryak C, *et al.* Single-walled carbon nanotube interactions with HeLa cells. *J Nanobiotechnol* 2007; 5: 8.
- [67] Raffa V, Cioffani G, Ntodas S, *et al.* Can the properties of carbon nanotubes influence their internalization by living cells?. *Carbon* 2008; 46: 1600-10.
- [68] Holt BD, Short PA, Rape AD, Wang YL, Islam MF, Dahl KN. Carbon nanotubes reorganize actin structures in cells and *ex vivo*. *ACS Nano* 2010; 4: 4872-8.
- [69] Ju L, Zhang G, Zhang X, *et al.* Proteomic analysis of cellular response induced by multiwalled carbon nanotubes exposure in A549 cells. *PLoS One* 2014; 9: e84974.
- [70] Shams H, Holt BD, Mahboobi SH, *et al.* Actin reorganization through dynamic interactions with single-wall carbon nanotubes. *ACS Nano* 2014; 8: 188-97.
- [71] Pampaloni F, Florin EL. Microtubule architecture: inspiration for novel carbon nanotube-based biomimetic materials. *Trends Biotechnol* 2008; 26: 302-10.
- [72] Rodríguez-Fernández L, Valiente R, González, G, Villegas JC, Fanarraga ML. Multiwalled carbon nanotubes display microtubule biomimetic properties *in vivo*, enhancing microtubule assembly and stabilization. *ACS Nano* 2012; 6: 6614-25.
- [73] Dinu CZ, Bale SS, Zhu G, Dordick JS. Tubulin encapsulation of carbon nanotubes into functional hybrid assemblies. *Small* 2009; 5: 310-5.
- [74] García Hevia L, Fernández F, Grávalos C, García A, Villegas JC, Fanarraga ML. Nanotube interactions with microtubules: implications for cancer medicine. *Nanomedicine* 2014; 9: 1581-8.
- [75] Nagai H, Okazaki Y, Chew SH, *et al.* Diameter and rigidity of multiwalled carbon nanotubes are critical factors in mesothelial injury and carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108: 1330-8.
- [76] Hamilton RF Jr, Wu Z, Mitra S, Shaw PK, Holian A. Effect of MWCNT size, carboxylation, and purification on *in vitro* and *in vivo* toxicity, inflammation and lung pathology. *Part Fibre Toxicol* 2013; 13: 10-57.
- [77] Park S, Srivastava D, Cho K. Generalized chemical reactivity of curved surfaces: Carbon nanotubes. *NanoLett* 2003; 3: 1273-7.
- [78] Jiang Y, Zhang H, Wang Y, Chen M, Ye S, Hou Z, Ren L. Modulation of apoptotic pathways of macrophages by surface-functionalized multiwalled carbon nanotubes. *PLoS One* 2013; 8: e65756.
- [79] Ding L, Stilwell J, Zhang T, *et al.* Molecular characterization of the cytotoxic mechanism of multiwall carbon nanotubes and nanofibers on human skin fibroblast. *NanoLett* 2005; 5: 2448-64.
- [80] Wang J, Sun P, Bao Y, Liu J, An L. Cytotoxicity of single-walled carbon nanotubes on PC12 cells. *Toxicol In Vitro* 2011; 25: 242-50.
- [81] Ye S, Jiang Y, Zhang H, *et al.* Multiwalled carbon nanotubes induce apoptosis in RAW 264.7 cell-derived osteoclasts through mitochondria-mediated death pathway. *J Nanosci Nanotechnol* 2012; 12: 2101-12.
- [82] Wang X, Guo J, Chen T, *et al.* Multiwalled carbon nanotubes induce apoptosis via mitochondrial pathway and scavenger receptor. *Toxicol In Vitro* 2012; 26: 799-806.
- [83] C.S. Sharma, S. Sarkar, A. Periyakaruppan, *et al.* Single-walled carbon nanotubes induces oxidative stress in rat lung epithelial cells. *J Nanosci Nanotechnol* 2007; 7: 2466-72.
- [84] Villegas JC, Álvarez-Montes L, Rodríguez-Fernández L, González J, Valiente R, Fanarraga ML. Multiwalled carbon nanotubes hinder microglia function interfering with cell migration and phagocytosis. *Adv Healthc Mater* 2014; 3: 424-32.
- [85] Dong C, Kashon ML, Lowry D, *et al.* Exposure to carbon nanotubes leads to changes in the cellular biomechanics. *Adv Healthc Mater* 2013; 2: 945-51.
- [86] Huang HC, Shi J, Orth JD, Mitchison TJ. Evidence that mitotic exit is a better cancer therapeutic target than spindle assembly. *Cancer Cell* 2009; 16: 347-58.
- [87] Biris AS, Boldor D, Palmer J, *et al.* Nanophotothermolysis of multiple scattered cancer cells with carbon nanotubes guided by time-resolved infrared thermal imaging. *J Biomed Opt* 2009; 14: 021007.
- [88] Iancu C, Mocan L. Advances in cancer therapy through the use of carbon nanotube-mediated targeted hyperthermia. *Int J Nanomed* 2011; 6: 1675-84.
- [89] Bellucci S, Dinicola S, Coluccia, P, *et al.* Multiwalled carbon nanotubes-induced cytotoxic effects on human breast adenocarcinoma cell line. *Semiconductor Conference (CAS), IEEE Conf Pub* 2012; 1: 37-42.
- [90] Alarifi S, Ali D, Verma A, Almajhdi FN, Al-Qahtani AA. Single-walled carbon nanotubes induce cytotoxicity and DNA damage via reactive oxygen species in human hepatocarcinoma cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2014; 50: 714-22.
- [91] Roda E, Castoldi A, Coccini, T, *et al.* *In vitro* toxicity assessment of single- and multiwalled carbon nanotubes in human astrocytoma and lung carcinoma cells. *Toxicol Lett* 2007; 172S: S235.
- [92] Vittorio O, Raffa V, Cuschieri A. Influence of purity and surface oxidation on cytotoxicity of multiwalled carbon nanotubes with human neuroblastoma cells. *Nanomedicine* 2009; 5: 424-31.
- [93] Han YG, Xu J, Li ZG, Ren GG, Yang Z. *In vitro* toxicity of multiwalled carbon nanotubes in C6 rat glioma cells. *Neurotoxicology* 2012; 33: 1128-34.
- [94] Mooney E, Dockery P, Greiser U, Murphy M, Barron V. CNTs and mesenchymal stem cells: biocompatibility, proliferation and differentiation. *NanoLett* 2008; 8: 2137-43.

- [95] Chin SF, Baughman RH, Dalton AB, *et al.* Amphiphilic helical peptide enhances the uptake of single-walled CNTs by living cells. *Exp Biol Med* 2007; 232: 1236-44.
- [96] Malarkey EB, Parpura V. CNTs in neuroscience. *Acta Neurochir Suppl* 2010; 106: 337-41.
- [97] Ryoo SR, Kim YK, Kim MH, Min DH. Behaviors of NIH-3T3 fibroblasts on graphene/carbon nanotubes: proliferation, focal adhesion, and gene transfection studies. *ACS Nano* 2010; 4: 6587-98.
- [98] Lobo AO, Antunes EF, Machado AHA, Pacheco-Soares C, Trava-Airoldia VJ, Corata EJ. Cell viability and adhesion on as-grown multi-wall carbon nanotube films. *Mater Sci Eng C* 2007; 28: 264-9.
- [99] Ravichandran P, Baluchamy S, Gopikrishnan R, *et al.* Pulmonary biocompatibility assessment of inhaled single-wall and multiwall carbon nanotubes in BALB/c mice. *J Biol Chem* 2011; 286: 29725-33.
- [100] Van Berlo D, Wilhelmi V, Boots AW, *et al.* Apoptotic, inflammatory, and fibrogenic effects of two different types of multiwalled carbon nanotubes in mouse lung. *Arch Toxicol* 2014; 88: 1725-37.
- [101] Ali-Boucetta H, Nunes A, Sainz R, *et al.* Asbestos-like pathogenicity of long carbon nanotubes alleviated by chemical functionalization. *Angew Chem Int Ed Engl* 2013; 52: 2274-8.
- [102] Antunes EF, Lobo AO, Corat EJ, Trava-Airoldia VJ, Martin AA, Verissimo C. Comparative study of first- and second-order Raman spectra of MWCNT at visible and infrared laser excitation. *Carbon* 2006; 44: 2202-11.
- [103] Dresselhaus S, Dresselhaus G, Saito R, Jorio A. Raman spectroscopy of carbon nanotubes. *Phys Rep* 2005; 409: 47-99.
- [104] Du J, Ge C, Liu Y, *et al.* The interaction of serum proteins with carbon nanotubes depend on the physicochemical properties of nanotubes. *J Nanosci Nanotechnol* 2011; 11: 10102-10.
- [105] Ge C, Du J, Zhao L, *et al.* Binding of blood proteins to carbon nanotubes reduces cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108: 16968-73.
- [106] Xie HR, Hu LS, Li GY. SH-SY 5Y human neuroblastoma cell line: *in vitro* cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chin Med J (Engl)* 2010; 20: 1086-92.
- [107] Clark MJ, Homer N, O'Connor BD, *et al.* U87 MG decoded: the genomic sequence of a cytogenetically aberrant human cancer cell line. *PLoS Genet* 2010; 6: e1000832.
- [108] Ruiz-Ontañón P, Orgaz JL, Aldaz B, *et al.* Cellular plasticity confers migratory and invasive advantages to a population of glioblastoma-initiating cells that infiltrate peritumoral tissue. *Stem Cells* 2013; 31: 1075-85.
- [109] Grobosch T, Schwarze B, Felgenhauer N, Riesselmann B, Roscher S, Binscheck T. Eight cases of fatal and non-fatal poisoning with *Taxus baccata*. *Forensic Sci Int.* 2013; 227: 118-26.
- [110] Grobosch T, Schwarze B, Stoecklein D, Binscheck T. Fatal poisoning with *Taxus baccata*: quantification of paclitaxel (taxol A), 10-deacetyltaxol, baccatin III, 10-deacetylbaccatin III, cephalomannine (taxol B), and 3,5-dimethoxyphenol in body fluids by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 2012; 36: 36-43.

Inhibition of Cancer Cell Migration by Multiwalled Carbon Nanotubes

Lorena García-Hevia, Rafael Valiente, José L. Fernández-Luna, Emmanuel Flahaut, Lidia Rodríguez-Fernández, Juan C. Villegas, Jesús González, and Mónica L. Fanarraga*

Finding ways to control cancer at the primary site means the difference between life and death. Localized tumors can be eliminated by surgery and radiation therapy, and as a general rule do not represent a life-threatening problem. However, when cancer spreads to other tissues it becomes an incurable condition where treatments can only delay the progression of the disease and prolong survival.

Carbon nanotubes (CNTs) represent a highly versatile heterogeneous family of nanomaterials that display interesting physico-chemical properties.^[1] These nanomaterials are well known to interact with the biological matter, penetrating inside tissues and cells,^[2,3] leading to a plethora of side effects in living organisms.^[4–7] *In vitro*, CNTs can be actively captured by most cells.^[2,3] Once inside the cells, CNTs also intermingle with many subcellular structures at nanoscale, mostly filaments such as DNA,^[8] actin,^[9,10] or microtubules.^[5,11] In particular, multiwalled carbon nanotubes (MWCNTs) have been shown to contact cell surface receptors,^[2] translocate across cell membranes via the endocytic

pathway in both, phagocytic and nonphagocytic cells,^[2,3] and interfere with the microtubule function triggering antiproliferative and pro-apoptotic effects.^[5,10,11]

MWCNTs display interesting biomimetic properties with microtubules.^[11–13] These cytoskeletal elements are intracellular protein nanotubes that result from the self-association of tubulin into 4 nm polymers, known as protofilaments.^[14] Tubulin protofilaments are organized into a circle assembling a 25 nm diameter tube, the microtubule (Figure S1, Supporting Information). Thus, MWCNTs and microtubules are both 1D hollow nanofilaments with a similar length-to-diameter ratio, resiliency, self-assembly properties, and a comparable surface reactivity^[12] that favors their association into biosynthetic polymers both, *in vitro*^[13] and *in vivo*.^[11] There is however, a big difference between these two nanofilaments that has chief biotechnological implications. While CNTs are very stable filaments, microtubules are highly dynamic polymers that stochastically switch between phases of polymerization–depolymerization on the time scale of seconds both, *in vitro* and *in vivo*.^[15] During mitosis, the microtubule dynamic behavior increases 20- to 100-fold to assemble the so-called “mitotic spindle”, a microtubule-based structure responsible for the balanced segregation of the chromosomes between the daughter cells.^[15,16] Some of the most widely used antineoplastic drugs such as paclitaxel (taxol) and their derivatives are microtubule-binding chemicals that behave as spindle poisons, inhibiting cell proliferation, leading to mitotic arrest and cell death.^[17–19]

MWCNTs interact tubulin intracellularly assembling biosynthetic filaments.^[11] These hybrid microtubules display a significantly enhanced stability compared to the standard tubulin polymers that favors noncentrosomal cytoplasmic microtubule nucleation. As the word “centrosome” means, this structure is a key organizer of the microtubule cytoskeleton in the cell, participating in all cellular activities including cell division and migration. CNT-triggered centrosomal abnormalities are well documented in the literature. These include aberrant mitotic spindle assemblies, chromosomal malsegregation, abnormal interphase microtubule arrays, and cytotoxicity in general.^[5,11,19] Since centrosomal positioning is a key structure in migrating cells, conferring membrane and cytoskeletal directionality, here we determine if MWCNTs have the intrinsic ability to hinder cancer cell spreading and discuss the molecular mechanics behind this effect.

For the study we first determined the position and trajectory of the centrosome in migrating HeLa cells treated with MWCNTs. As a rule of thumb, migrating cells display a polarized morphology^[20] determined by the so-called, nuclear-centrosomal axis (Figure 1A). This axis, first identified by Van Beneden in the 1880s,^[21] contributes to the asymmetric organization of

L. García-Hevia
Departamento de Biología Molecular
Universidad de Cantabria-IDIVAL
39011 Santander, Spain

Dr. R. Valiente
Departamento de Física Aplicada
Facultad de Ciencias
Universidad de Cantabria-IDIVAL
39005 Santander, Spain

Dr. J. L. Fernández-Luna
Hospital Valdecilla-IDIVAL
39011 Santander, Spain

Dr. E. Flahaut
CNRS, Institut Carnot CIRIMAT
Université de Toulouse
F-31062 Toulouse, France

Dr. L. Rodríguez-Fernández
SERMET
Universidad de Cantabria
39005 Santander, Spain

Dr. J. C. Villegas
Departamento de Anatomía y Biología Celular
Universidad de Cantabria-IDIVAL
39011 Santander, Spain

Dr. J. González
MALTA-Consolider Team, CITIMAC, Facultad de Ciencias
Universidad de Cantabria-IDIVAL
39005 Santander, Spain

Dr. M. L. Fanarraga
Departamento de Biología Molecular
Universidad de Cantabria-IDIVAL
39011 Santander, Spain
E-mail: fanarrag@unican.es



DOI: 10.1002/adhm.201500252

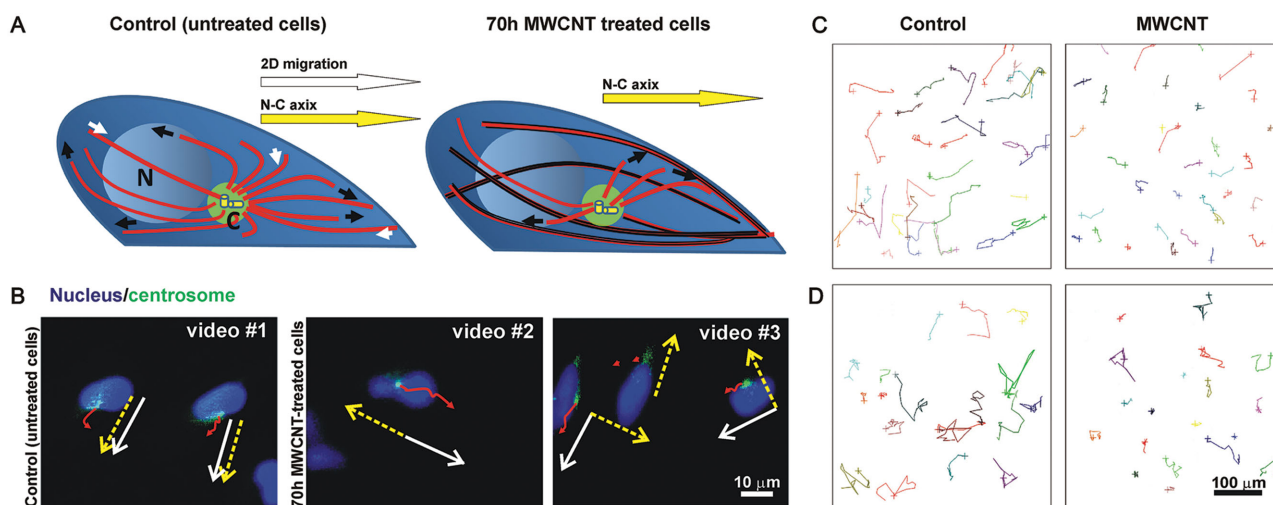


Figure 1. MWCNTs produce centrosomal mispositioning and disrupt the nuclear-centrosomal axis hindering cell migration. A) Diagram of the disposition of the nucleus (N), centrosome (C, green), and microtubule array (red filaments) in control and MWCNT-treated (MWCNTs in black) migrating cells. Microtubule traction forces are also represented (small white and black arrows). The cell polarity and migratory direction (white arrow) relative to the nuclear-centrosomal axis (yellow arrow) is indicated. B) Frozen live-cell images obtained from time-lapse videos S1–S3 (Supporting Information) of migrating HeLa cells displaying labeled nuclei (blue) and centrosomes (green). The centrosomal trajectories (red arrows), average cell trajectories (white arrows), and nuclear-centrosomal axes (yellow arrows) are shown for MWCNT-treated cells and untreated controls. C,D) Representative glioblastoma (U87MG) and neuroblastoma (SH-SY5Y) 5 h cell tracking trajectories, respectively. Cultures grown in the absence (control) or presence of MWCNTs were recorded during 70 h. Individual cell trajectories indicated by colored lines, are shorter in cells incubated with MWCNTs.

cell structure during migration, and corresponds to the final direction of the displacement.^[22] Microtubules, connected to the migrating front of the cell, pull forward the centrosome dragging the nucleus forward, thus redistributing the traction forces generated at the cell's migrating front, to the centrosome, and throughout the cytoplasm to produce an effective net cell body translation. Accordingly, in cells migrating on 2D substrates, the centrosome is typically positioned between the nucleus and the leading edge, along this axis. To determine the orientation of nuclear-centrosomal axis we performed time-lapse video microscopy on live HeLa cells displaying fluorescently labeled centrosomes and nuclei (Experimental section). This allowed comparing this axis with the direction of the cell trajectory in migrating MWCNT-treated cells and untreated controls. As summarized in Figure 1B, in frozen live-cell images obtained from Videos S1–S3 (Supporting Information), the centrosomes in MWCNT-treated cells displayed a random perinuclear location and were aberrantly positioned with respect to the nuclear trajectory. As a result, in MWCNT-treated cells the direction of the cell migration (white arrows) and the nuclear-centrosomal axes (yellow arrows) were not parallel. Conversely, in untreated-control HeLa cells centrosomes were located along the nuclear-centrosomal axis, between the nucleus and the leading edge of the cells, just as described by Van Beneden.^[21]

To investigate the consequences of these findings, we calculated the average migration speed of control and MWCNT-treated cells using cell tracking analysis (Experimental Section). For the study we investigated various cancer cell lines including: (i) HeLa cells; (ii) MCF7 cells, a human breast cancer cell line; (iii) SH-SY5Y cells, a neuroblastoma cell line originally established from a metastatic tumor; and (iv) U87MG cells, a grade IV human glioma cell line. Cells were incubated with $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ MWCNTs for 70 h and were time-lapse video

recorded for 5 h. This MWCNT concentration produced no obvious signs of toxicity but revealed a reduction of more than 40% in the average speed of HeLa cells treated with MWCNTs. A statistically significant cell speed reduction was also shown for the other two fast-migrating cancer cell lines, SH-SY5Y and U87MG when exposed to MWCNTs (Table 1, and Figure 1C,D). A possible interference with MWCNTs settled on the growing matrix was also considered. However, under our functionalization conditions MWCNTs precipitation or aggregation on the growing matrix is never observed. Besides, recent studies have shown that CNTs facilitate cell migration.^[23]

To further demonstrate our hypothesis we decided to replicate this experiment on real tumor cells isolated from surgical specimens. Characteristically, tumor explant derived cancer cells are much more heterogeneous than most cancer cell line models. We chose glioblastoma multiforme cells (GBM) for the study because these cells typically infiltrate the surrounding brain tissue leading to tumor recurrence after surgery. Glioblastomas are the most common and aggressive primary brain tumor in adults, and have an unfavorable prognosis with a median survival time of less than 15 months, mostly due to recurrence. For the study we isolated GBM cells from surgical specimens that were fully characterized^[24] before exposure to $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ MWCNTs for 70 h. This experiment served to confirm that MWCNTs also triggered a significant antimigratory effect (18% speed reduction) in real tumor-derived cells (Figure 2A, Table 1).

The presence of intracellular MWCNTs in GBM cells was confirmed using confocal Raman spectroscopy focusing the laser within the cell's cytoplasm. We observed differences in the peak positions in the spectrum of intracellular MWCNTs, slightly shifted to higher wavenumbers (Figure 2B, inset), together with a decrease in Raman intensities of the D, G, and G'

Table 1. Migration inhibitory effect of MWCNTs for different cancer cells types.

Cell type	Control speed ^{a)}	MWCNT speed ^{a)}	Speed reduction [%]	DF ^{b)}	t/p ^{c)}	% Statistical significance
HeLa	12.7 ± 0.6	7.4 ± 0.4	41	245	7.2/<10 ⁻¹⁰	>99.99
MCF7	1.6 ± 0.1	1.5 ± 0.1	6	130	0.4/0.64	NS
SH-SY5Y	8.7 ± 0.7	6.8 ± 0.4	22	114	2.3/0.02	95–98
U87MG	8.5 ± 0.2	6.1 ± 0.2	28	249	7.1/<10 ⁻¹⁰	>99.99
GBM	9.2 ± 0.2	7.5 ± 0.1	18.5	408	6.5/<10 ⁻⁹	>99.99

^{a)}Average speed is shown in nm s⁻¹; ^{b)}DF = degrees of freedom; ^{c)} t/p = Student's t -test and p probability.

modes (Figure 2B and Table S1, Supporting Information). As it has been previously shown, CNTs exhibit variations in the relative Raman intensities and/or positions for various Raman modes depending on different physical^[25] or chemical^[26,27] environments and according to their agglomeration state. In this study, functionalized intracellular MWCNTs display a well-pronounced G mode indicative of a significant dispersion. The overall data also indicated that the coating of MWCNTs did not significantly affect the G mode profile, as previously reported for noncovalently modified SWCNTs dispersed in aqueous solutions containing peptides^[25–31] or proteins.^[32,33] The precise cytoplasmic distribution of the

intracellular MWCNTs was also determined on a single confocal Z-plane obtained across the GBM cell cytoplasm using confocal Raman imaging, following the G band at 1586 cm⁻¹ (Figure 2C,D). This technique revealed how intracellular MWCNTs were localized in small spots throughout the cytoplasm, a distribution coinciding with that previously described in MWCNT-treated cell lines.^[11] These experiments demonstrate how MWCNTs can also translocate inside surgical specimen-derived cancer cells, and how these nanomaterials can also hinder GBM cell spreading.

Finally, we also explored if the observed antimigratory effect was dose-dependent. For the study we treated all the

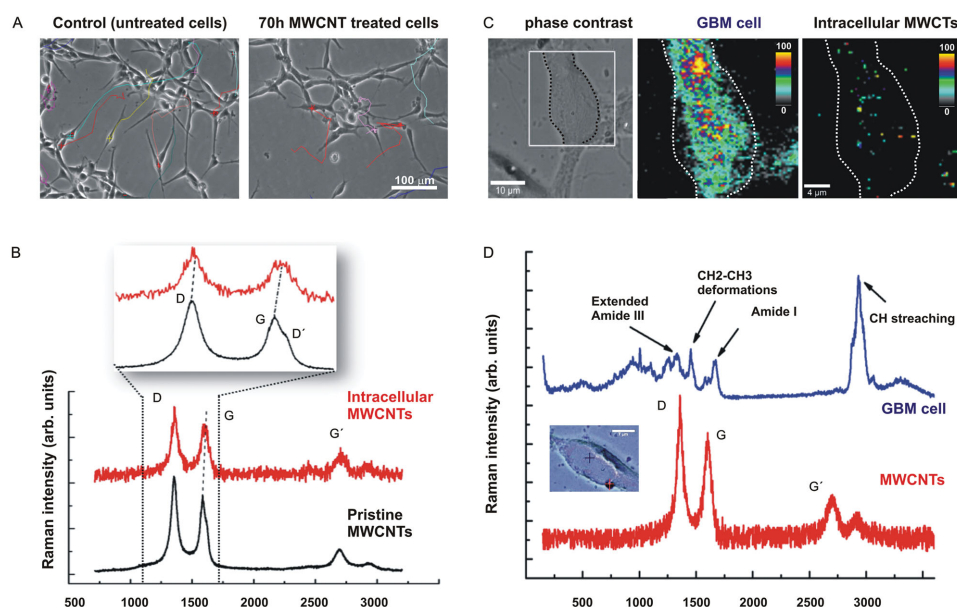


Figure 2. MWCNTs translocate into the cytoplasm of surgical specimen-derived cancer cells and interfere with cell spreading. A) Phase contrast microscopy images of the primary cultures of GBM cells obtained from surgical specimens. Both control and MWCNT-treated cells display a long bipolar morphology and no observable toxicity signs. Colored lines indicate 5 h cell trajectories. B) Comparison between the Raman spectra of pristine MWCNTs (black) and intracellular MWCNTs (red trace). These Raman spectra were obtained with a 532 nm line of a linear polarized frequency doubled Nd:YAG laser. The inset shows a detail of the typical fingerprints expected for MWCNTs spectral region corresponding to the D and G bands in order to point out the blue-shift of the Raman peak frequencies associated with the functionalization of the intracellular MWCNTs. Though only minor differences in the peak positions are observed, the spectrum of MWCNTs treated glioblastoma cell is slightly shifted to higher wavenumbers and a decrease in Raman intensities of D and G and G' modes are observed (Table S1, Supporting Information). C) Phase contrast image of a GBM cell captured through 100× objective of the confocal Raman microscope. (Center) Single confocal Z-plane Raman image of the same cell obtained integrating the intensities in the 2800–3000 cm⁻¹ region (C–H stretching), integration time of 0.3 s × 10 accumulations, and a point spacing of 0.36 μm. (Right) Confocal Raman image obtained at the same confocal Z-plane to determine the localization of intracellular MWCNTs integrating the Raman intensities of the G band (1500–1700 cm⁻¹ region). As shown in the color scale (indicating maximum/minimum CCD counts), bright yellow hues indicate the highest signals and gray hues low integrated G band intensities. D) Confocal Raman spectra of the cytoplasm of a MWCNT-treated GBM cell (inset, blue cross) and extracellular functionalized MWCNTs (inset, red cross). Integration time of 0.5 s × 10 accumulations and 0.3 s × 10 accumulations, respectively.

neural-derived cell lines and the primary GBM cell cultures with 0, 25, 50, and 75 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of MWCNTs in the growing medium for 70 h. Again, this analysis confirmed a statistically significant speed reduction, of up to 62%, with dosages of 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Table S2, Supporting Information). Larger dosages (75 $\mu\text{g mL}^{-1}$) triggered a massive cytotoxic effect, suggesting excess MWCNTs probably interfere with some other critical cellular processes leading to cell death.

The interaction of nanomaterials with proteins or lipids, the actual biological building blocks, is still poorly understood as reviewed by Tay and colleagues.^[34] These studies demonstrate that MWCNTs could play a pivotal role in cancer treatment in combination to standard therapies interfering with cancer cell migration. Other nanomaterials such as TiO_2 , SiO_2 , and hydroxyapatite nanoparticles have also been recently shown to interfere with cell migration damaging the microtubule network.^[35] Our work demonstrates that MWCNTs could play a pivotal role in cancer treatment in combination to standard therapies interfering with cancer cell migration. We have previously documented the molecular interaction of MWCNTs with tubulin intracellularly,^[11] and how the biomimetic properties of MWCNTs obstruct microtubule function during mitosis behaving as spindle poisons, same as traditional microtubule-binding drugs such as taxol. Remarkably, the interaction of MWCNTs with the microtubule is not site-specific. Instead MWCNTs appear to interact along the protofilament surface,^[36] and this fact has two major advantages. First, MWCNTs do not require a specific binding site in the tubulin molecule subject of mutations. And second, the MWCNTs interaction with microtubules permits other microtubule-binding drugs to interact with their structural pocket in the tubulin molecule. Here we show how, in addition to the antiproliferative effect of MWCNTs, these nanomaterials also display important antimigratory effects in cancer cells. This new intrinsic feature of MWCNTs could significantly boost the mechanism of action of traditional microtubule-binding cytotoxic chemotherapies^[16–18] and thus might serve to bypass some of the drug-resistance mechanisms in cancer cells.^[37] Being metastasis the primary cause of death for most cancers, we believe these new properties of MWCNTs position these nanomaterials as a new ground-breaking type of future synthetic microtubule-stabilizing therapies that could play a pivotal role in future cancer treatment.

Experimental Section

MWCNTs Synthesis and Characterization: CNTs of 3–12 walls, with outer diameter ranging from 5 to 15 nm were synthesized following the catalytic chemical vapor deposition method using Co and Mo particles as catalyst.^[38] An aqueous HCl treatment procedure was applied to clean and separate the MWCNTs from contaminants. The as-prepared MWCNTs were characterized by various techniques including Raman spectroscopy, transmission electron microscopy (TEM), and thermogravimetric analyses (TGA) (Figure S2, Supporting Information). MWCNTs produce a characteristic Raman spectrum distinguishable of SWCNTs spectrum revealing typical MWCNT resonances^[39,40] such as the dispersive disorder induced D band at 1330 cm^{-1} , the tangential G band at 1586 cm^{-1} , and the D' band at 1614 cm^{-1} . TEM was performed in a JEOL JEM 2100 microscope operating at 120 kV. Samples were prepared using ethanol as dispersant and omitting the sample centrifugation steps.

A drop of this suspension was adsorbed onto a Lacey copper grid. The TGA was performed with a Perkin Elmer Pyris 1 system. Measurements were conducted by heating 9–12 mg of MWCNTs in dry air from 35 °C up to 1000 °C at a rate of 2 °C min^{-1} . TGA results showed a typical characteristic CNT curve where the oxidations of hexagonal carbon ring appeared at 550 °C. Qualitative information on the purity of CNT could be obtained from the TGA based on the extent of nonoxidizable residues at high temperature. In our measurements, catalytic metal impurities were not observed between 600 and 1000 °C. All these techniques confirmed the absence of undesired impurities in these MWCNTs samples.

MWCNTs Dispersion and Functionalization: CNTs were debundled and dispersed by repeated cycles of vortex mixing followed by mild sonication (3 min, frequency of 20 kHz, 130 W in a SONICS Vibracell VCX130) and centrifugation in cell culture medium (Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) from Sigma-Aldrich) containing serum and antibiotics as previously described.^[10,11] The stability of the stock suspension was checked by centrifugation at 14 000 g after each sonication cycle. Visible absorption was used to determine MWCNT concentration in the 400–600 nm range. Further details of the stability and dispersion of MWCNTs in the cell culture medium can be found in previous work.^[10,11] A total of 3–5 cycles were sufficient to obtain a well-dispersed concentrated suspension of MWCNTs which was rediluted in culture medium to the concentrations indicated in the text.

Confocal Raman Spectroscopy Imaging: A confocal Raman microscope (Alpha300, WITec) equipped with a piezo scanner and a linear polarized frequency doubled Nd:YAG laser (532 nm excitation wavelength) focused through an air objective (Nikon, 100 \times , NA = 0.9) was used. To avoid damage and heating, the laser power was controlled below 2 mW. The spatial resolution is diffraction limited. In the setup used, features at a distance of $r = 0.61 \times 532/0.9 = 0.36\text{ }\mu\text{m}$ can be distinguished and completely resolved at a distance of $0.72\text{ }\mu\text{m}$. Mapping was done for the stack scan with a step size of $0.36\text{ }\mu\text{m}$ in X/Y and a constant Z (depth) in a square of $23 \times 25\text{ }\mu\text{m}$ on X/Y. To get a better signal-to-noise ratio, every spectrum was acquired with an integration time of 0.3 s, meaning $75 \times 75 = 5625$ spectra for one image. Images from this multispectra file were computed by integrating the appropriate Raman peaks using the ScanCtrlSpectroscopyPlus software (WITec, Germany). The images were constructed mapping the signals of G mode ($1500\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$) and the C–H stretching in the $2800\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$ region.^[39,40]

Cell Culture, Cell Tracking, and Imaging Techniques: The human cancer cell line models used (HeLa, MCF7, SH-SY5Y, and U87MG) have been thoroughly characterized in the literature.^[41–43] Primary GBM cell cultures have been previously characterized by our group.^[24] Cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium containing 10% serum at 37 °C, 5% CO_2 and were exposed to 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ MWCNTs concentration in the culture medium for 70 h (unless otherwise indicated). Controls and MWCNT-treated cells were grown on the same culture plate and were imaged simultaneously. Centrosomal trajectories were labeled by gene transfer with a vector expressing GFP:EB1 in HeLa cells 24 h before exposure to MWCNTs in the medium. This vector was kindly provided by Dr. Akhmanova (Utrecht University, The Netherlands). Nuclear DNA was labeled with Hoechst dye (bis-benzimide) (Sigma-Aldrich). Cell tracking analysis was performed on time-lapse video microscopy movies obtained @ 15 min/frame during 5 h on a Nikon Eclipse Ti live-cell station, using a 10 \times Nikon NA 0.45. Quantification analysis was performed with the NIS-Elements software. The average cell migration speed was obtained for a minimum of hundred cells in at least three sets of experiments for each condition. Actual numbers of analyzed cells are designated in Table 1 as degrees of freedom (DF). Unpaired two-tailed Student's t-test was used for the statistical evaluation of differences between control and treated cells. Probability (*p*) values are also shown.

Supporting Information

Supporting Information is available from the Wiley Online Library or from the author.

Acknowledgements

The authors are very grateful to L. Álvarez-Montes and J. Díaz-Gómez for their help and to the Nikon ATR Laser Microscopy Unit of the IDIVAL Institute. The authors also thank Dr. Baylo and Dr. Toporski of the WITec Company for their help with the confocal Raman imaging. This work was supported by the Spanish ISCIII-MINECO under Projects ref. PI13/01074, AES 2013, MAT2012-38664-C02-01; MALTA Consolider-Ingenio ref. CSD2007-00045, PI10/02002, AES 2010; and the Spanish ISCIII programs RTICC refs. RD06/0020/0074 and RD12/0036/0022. The authors especially thank Fundación Eugenio Rodríguez Pascual ("ayudas de investigación" 2014, ref. 02-H048-64003).

Received: April 9, 2015

Revised: May 4, 2015

Published online:

- [1] S. Park, D. Srivastava, K. Cho, *Nano Lett.* **2003**, *3*, 1273.
- [2] X. Shi, A. Von demBussche, R. H. Hurt, A. B. Kane, H. Gao, *Nat. Nanotechnol.* **2011**, *6*, 714.
- [3] L. Lacerda, J. Russier, G. Pastorin, M. A. Herrero, E. Venturelli, H. Dumortier, K. T. Al-Jamal, M. Prato, K. Kostarelos, A. Bianco, *Biomaterials* **2012**, *33*, 3334.
- [4] E. Mooney, P. Dockery, U. Greiser, M. Murphy, V. Barron, *Nano Lett.* **2008**, *8*, 2137.
- [5] L. M. Sargent, A. F. Hubbs, S. H. Young, M. L. Kashon, C. Z. Dinu, J. L. Salisbury, S. A. Benkovic, D. T. Lowry, A. R. Murray, E. R. Kisin, K. J. Siegrist, L. Battelli, J. Mastovich, J. L. Sturgeon, K. L. Bunker, A. A. Shvedova, S. H. Reynolds, *Mutat. Res., Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **2012**, *745*, 28.
- [6] A. E. Porter, M. Gass, K. Muller, J. K. Skepper, P. A. Midgley, M. Welland, *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2*, 713.
- [7] H. Ali-Boucetta, A. Nunes, R. Sainz, M. A. Herrero, B. Tian, M. Prato, A. Bianco, K. Kostarelos, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 2274.
- [8] X. Li, Y. Peng, X. Qu, *Nucl. Acids Res.* **2006**, *34*, 3670.
- [9] H. Shams, B. D. Holt, S. H. Mahboobi, Z. Jahed, M. F. Islam, K. N. Dahl, M. R. Mofrad, *ACS Nano* **2014**, *8*, 188.
- [10] J. C. Villegas, L. Álvarez-Montes, L. Rodríguez-Fernández, J. González, R. Valiente, M. L. Fanarraga, *Adv. Healthcare Mater.* **2014**, *3*, 424.
- [11] L. Rodríguez-Fernández, R. Valiente, J. González, J. C. Villegas, M. L. Fanarraga, *ACS Nano* **2012**, *6*, 6614.
- [12] F. Pampaloni, E. L. Florin, *Trends Biotechnol.* **2008**, *26*, 302.
- [13] C. Z. Dinu, S. S. Bale, G. Zhu, J. S. Dordick, *Small* **2009**, *5*, 310.
- [14] E. Nogales, M. Whittaker, R. A. Milligan, K. H. Downing, *Cell* **1999**, *96*, 79.
- [15] T. Mitchison, M. Kirschner, *Nature* **1984**, *312*, 237.
- [16] M. A. Jordan, L. Wilson, *Curr. Opin. Cell Biol.* **1998**, *1*, 123.
- [17] D. R. Matson, P. T. Stukenberg, *Mol. Interventions* **2011**, *11*, 141.
- [18] J. Zhou, P. Giannakakou, *Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Agents* **2005**, *5*, 65.
- [19] L. Gonzalez, I. Decordier, M. Kirsch-Volders, *Biochem. Soc. Trans.* **2010**, *38*, 1691.
- [20] G. W. Luxton, G. G. Gundersen, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2011**, *23*, 579.
- [21] E. Van Beneden, *Arch. Biol.* **1883**, *4*, 265.
- [22] R. Li, G. G. Gundersen, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9*, 860.
- [23] a) A. Bédier, F. Seichepine, E. Flahaut, I. Loubinoux, L. Vaysse, C. Vieu, *Langmuir* **2012**, *28*, 17363; b) A. Bédier, F. Seichepine, E. Flahaut, I. Loubinoux, L. Vaysse, C. Vieu, *Langmuir* **2012**, *28*, 17363.
- [24] P. Ruiz-Ontañón, J. L. Orgaz, B. Aldaz, A. Elosegui-Artola, J. Martino, M. T. Berciano, J. A. Montero, L. Grande, L. Nogueira, S. Diaz-Moralli, A. Esparís-Ogando, A. Vazquez-Barquero, M. Lafarga, A. Pandiella, M. Cascante, V. Segura, J. A. Martinez-Clement, V. Sanz-Moreno, J. L. Fernandez-Luna, *Stem Cells* **2013**, *31*, 1075.
- [25] M. J. O'Connell, S. M. Bachilo, C. B. Huffman, V. C. Moore, M. S. Strano, E. H. Haroz, K. L. Rialon, P. J. Boul, W. H. Noon, C. Kittrell, J. Ma, R. H. Hauge, R. B. Weisman, R. E. Smalley, *Science* **2002**, *297*, 593.
- [26] D. A. Heller, P. W. Barone, J. P. Swanson, R. M. Mayrhofer, M. S. Strano, *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 6905.
- [27] M. S. Strano, C. B. Huffman, V. C. Moore, M. J. O'Connell, E. H. Haroz, J. Hubbard, M. Miller, K. Rialon, C. Kittrell, S. Ramesh, R. H. Hauge, R. E. Smalley, *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 6979.
- [28] E. Joselevich, H. Dai, J. Liu, K. Hata, A. H. Windle, *Carbon Nanotubes, Topics in Applied Physics*, Vol. 111 (Eds: A. Jorio, D. S. Dresselhaus, G. Dresselhaus), Springer-Verlag, Germany **2008**.
- [29] S. F. Chin, R. H. Baughman, A. B. Dalton, G. R. Dieckmann, R. K. Draper, C. Mikoryak, I. H. Musselman, V. Z. Poenitzsch, H. Xie, P. Pantano, *Exp. Biol. Med.* **2007**, *232*, 1236.
- [30] M. S. Arnold, M. O. Guler, M. C. Hersam, S. I. Stupp, *Langmuir* **2005**, *21*, 4705.
- [31] G. R. Dieckmann, A. B. Dalton, P. A. Johnson, J. Razal, J. Chen, G. M. Giordano, E. Muñoz, I. H. Musselman, R. H. Baughman, R. K. Draper, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 1770.
- [32] S. S. Karajanagi, H. C. Yang, P. Asuri, E. Sellitto, J. S. Dordick, R. S. Kane, *Langmuir* **2006**, *22*, 1392.
- [33] W. J. Huang, S. Taylor, K. Fu, Y. Lin, D. Zhang, T. W. Hanks, A. M. Rao, Y. P. Sun, *Nano Lett.* **2002**, *2*, 311.
- [34] C. Y. Tay, M. I. Setyawati, J. Xie, J. W. Parak, D. T. Leong, *Adv. Funct. Mater.* **2014**, *24*, 5936.
- [35] C. Y. Tay, P. Cai, M. I. Setyawati, W. Fang, L. P. Tan, C. H. Hong, X. Chen, D. T. Leong, *Nano Lett.* **2014**, *14*, 83.
- [36] L. García Hevia, F. Fernández, C. Grávalos, A. García, J. C. Villegas, M. L. Fanarraga, *Nanomedicine* **2014**, *9*, 1581.
- [37] G. A. Orr, P. Verdier-Pinard, H. McDaid, S. B. Horwitz, *Oncogene* **2003**, *22*, 7280.
- [38] E. Flahaut, C. H. Laurent, A. Peigney, *Carbon* **2005**, *43*, 375.
- [39] S. Dresselhaus, G. Dresselhaus, R. Saito, A. Jorio, *Phys. Rep.* **2005**, *409*, 47.
- [40] P. R. Griffiths, E. V. Miseso, *Infrared and Raman Instrumentation for Mapping and Imaging* (Eds: R. Salzer, H. W. Siesler), Wiley-VCH, Weinheim, Germany **2009**, pp 1–64.
- [41] H. D. Soule, J. Vazquez, A. Long, S. Albert, M. Brennan, *Natl. Cancer Inst.* **1973**, *51*, 1409.
- [42] H. R. Xie, L. S. Hu, G. Y. Li, *Chin. Med. J.* **2010**, *123*, 1086.
- [43] M. J. Clark, N. Homer, B. D. O'Connor, Z. Chen, A. Eskin, H. Lee, B. Merriman, S. F. Nelson, *PLoS Genet.* **2010**, *6*, e1000832.

Multiwalled Carbon Nanotubes Inhibit Tumor Progression in a Mouse Model

Lorena García-Hevia, Juan C. Villegas, Fidel Fernández, Íñigo Casafont, Jesús González, Rafael Valiente, and Mónica L. Fanarraga*

Understanding the molecular mechanisms underlying the biosynthetic interactions between particular nanomaterials with specific cells or proteins opens new alternatives in nanomedicine and nanotoxicology. Multiwalled carbon nanotubes (MWCNTs) have long been explored as drug delivery systems and nanomedicines against cancer. There are high expectations for their use in therapy and diagnosis. These filaments can translocate inside cultured cells and intermingle with the protein nanofilaments of the cytoskeleton, interfering with the biomechanics of cell division mimicking the effect of traditional microtubule-binding anti-cancer drugs such as paclitaxel. Here, it is shown how MWCNTs can trigger significant anti-tumoral effects *in vivo*, in solid malignant melanomas produced by allograft transplantation. Interestingly, the MWCNT anti-tumoral effects are maintained even in solid melanomas generated from paclitaxel-resistant cells. These findings provide great expectation in the development of groundbreaking adjuvant synthetic microtubule-stabilizing chemotherapies to overcome drug resistance in cancer.

cytotoxic^[14–16] effects *in vitro*, resulting of the physicochemical characteristics and morphology of these nanomaterials, conferring MWCNTs remarkable biomimetic properties that prompt their association with some of the naturally existing intracellular nanofilaments such as actin^[17] or microtubules^[11] that can be exploited to defeat cancer. These mechanical effects in addition to the well-known oxidative stress that MWCNT trigger in cells^[18] can be exploited to defeat cancer.

Microtubules are cytoskeletal polymers ubiquitous in all eukaryotic cells and key players in many cellular processes including cell division and migration. For these reasons, these protein filaments have long been considered ideal targets of many anticancer therapies including some of the most widely used drugs, such as paclitaxel (Taxol®) or the vinca alkaloids.^[19] Microtubules are 25 nm diameter

1. Introduction

Carbon nanotubes (CNTs) represent a class of highly versatile materials that display very interesting mechanical, thermal, electronic, and biological properties.^[1] These nanomaterials have been employed, among others, as drug^[2,3] or nucleic acid^[4,5] delivery systems, kill cancer cells by hyperthermia,^[6] or serve to detect tumors *in vivo*.^[6,7] There are several studies that point at the feasibility of targeting CNTs into tumors coating these nanomaterials with different biomolecules with tropism for cancer cells such as folates, transferrin, lectin, growth factor receptors, antibodies that recognize surface tumor overexpressed proteins, etc.^[6–8] CNT surface functionalization also makes possible to enhance blood circulation times, improving biodistribution and translocation into tumors.^[9,10] Recently, multiwalled carbon nanotubes (MWCNTs) have also been claimed to display intrinsic anti-proliferative,^[11,12] anti-migratory,^[13] and

nanotubes, constituted of 13 tubulin protein polymers, known as protofilaments, organized in a twisted cylinder (Figure 1).^[20] Interestingly, MWCNTs have been proposed as the technological counterpart of nature's microtubules for they share several aspects of their architecture and properties.^[21] They both have (i) similar dimensions, (ii) a tubular morphology that ensures structural efficiency, (iii) have an analogous mechanical behaviour, and finally (iv), both structures are exceptionally resilient, i.e., they can be bent to a small radius of curvature and are able to restore their original shape without damage.^[22–24] However, there is a big difference between these two filaments that has chief implications in the *in vivo* system, while MWCNTs are very stable, microtubules are highly dynamic polymers that continuously undergo assembly/disassembly cycles in a process known as dynamic instability.^[25] The many similarities that exist between MWCNTs and microtubules are likely to contribute to their association both, *in vitro*^[26] and *in vivo*.^[11] In cultured cells, tubulin and MWCNTs assemble biosynthetic microtubules that display an enhanced stability, resulting in important changes in the cell biomechanics.^[11,13,27] There are many evidences in different types of cells, including cancer cells, that MWCNTs trigger several mitotic defects (aberrant spindles, chromosome mal-segregation, clastogenic effects), inhibition of cell migration, finally triggering cell death.^[11,27,28] Thus *in vitro*, in cultured cells, MWCNTs mimic the effect of classic antineoplastic drugs.

L. García-Hevia, Dr. J. C. Villegas, Dr. F. Fernández,
Dr. Í. Casafont, Dr. J. González, Dr. R. Valiente,
Dr. M. L. Fanarraga
Grupo de Nanomedicina-IDIVAL
Universidad de Cantabria
Santander 39011, Spain
E-mail: fanarraga@unican.es



DOI: 10.1002/adhm.201500753

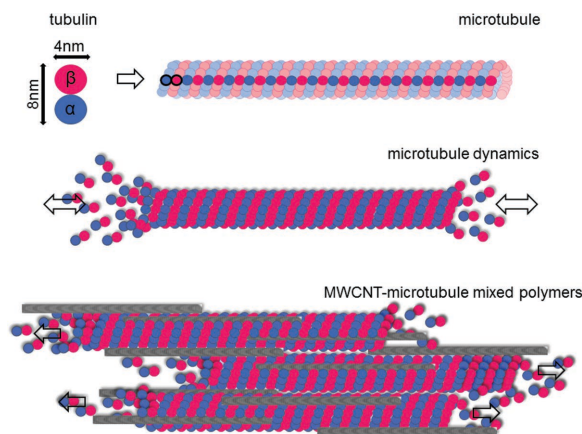


Figure 1. Microtubule-MWCNT interaction model. Microtubules are tubular polymers assembled of 13 protofilaments constituted of $\alpha\beta$ -tubulin subunits aligned in a head-to-tail fashion. Microtubules display a high dynamics both in vitro and in vivo. Microtubule depolymerization results of structural conformational changes in the $\alpha\beta$ -tubulin molecule that destabilizes the polymer. Intracellular MWCNTs associate with microtubules, stabilizing the tubulin polymers, interfering with the cell cytoskeleton function. This model is based on previous research.^[11,25]

Melanoma is the most aggressive type of skin cancer and although at early stages melanoma can be surgically removed, with a survival rate of 99%, metastasized melanoma is difficult to cure and has very high rates of mortality. Here, we evaluate the intrinsic anti-cancer properties of MWCNTs in tumors produced by malignant melanoma allotransplantation. Among the different cancer cell models available for the study, we selected B16-F10 murine cells. These cells, as most malignant melanomas, are (i) genetically heterogeneous, (ii) highly metastatic, (iii) display an aggressive nature, and (iv) are difficult to treat due to resistance.^[29]

2. Results

2.1. MWCNTs Translocate inside Malignant Melanoma Cells Producing Cytotoxicity and Interfering with Cell Division and Spreading

To investigate the antineoplastic properties of these nanomaterials in vivo in melanoma cells, we first confirmed in vitro, in this particular cell line, MWCNT intracellular translocation.

The presence of cytoplasmic MWCNTs was investigated using transmission electron microscopy (TEM) on section of MWCNT-treated melanoma cells. As shown in **Figure 2a–c** MWCNTs were detectable in bundles inside the cytoplasm. Intracellular MWCNTs were further demonstrated using confocal Raman spectroscopy, focusing the laser beam within the cell cytoplasm using the Raman spectra of pristine MWCNTs and untreated cell cytoplasm as controls (**Figure 2d**). The typical fingerprints expected for MWCNTs were observed in the intracellular spectrum obtained from MWCNT-treated cells together with peaks that correspond to cellular proteins. Both techniques confirmed the presence of MWCNTs inside the treated cells.

Microtubule network disorganization, centrosomal disappearance, cell enlargement, nuclear heterogeneity, etc., all indicative of the biomimetic interaction of MWCNTs with the cellular cytoskeleton as previously reported,^[11,12] were also detected in malignant melanoma treated cells (**Figure 3a–c**). MWCNTs also produced a patent anti-proliferative effect in these cultures resulting in statistically significantly longer cell proliferation intervals compared to untreated controls (**Figure 3d** and **Figure 4a**), and asymmetric cell divisions or *mitotic-slippage* processes causing larger cell sizes and polyploidies (**Figure 4b**, Videos S1 and S2, Supporting Information). These experiments also confirmed a slower migration speed in

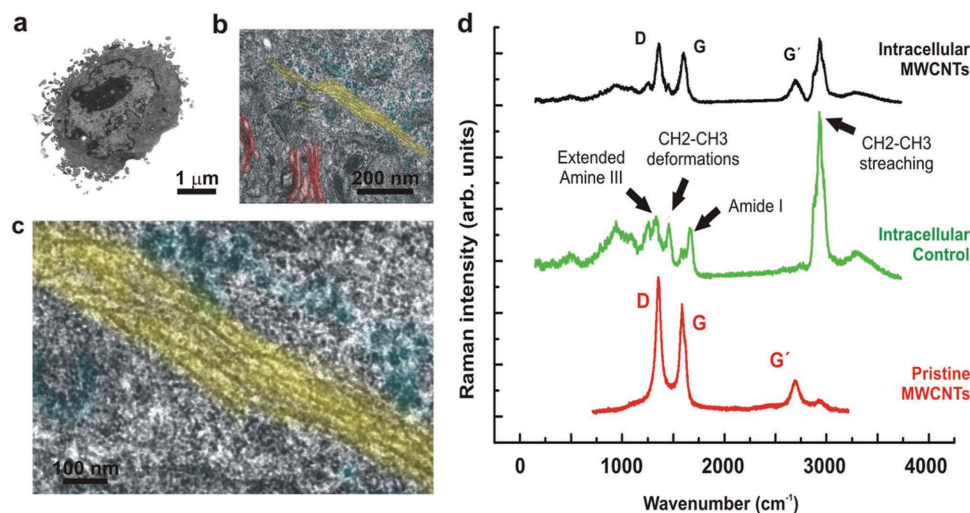


Figure 2. MWCNTs translocate inside malignant melanoma cells. a) Electron microscopy image of a cytoplasmic section of a B16-F10 melanoma cell treated in vitro with MWCNTs. b) High magnification image of the cytoplasm of the cell displaying MWCNTs (pseudo-colored in yellow). The Golgi membrane stacks and the ribosome-rich regions are pseudo-colored in red and blue, respectively. c) Intracellular bundles of MWCNTs filaments measuring an average of 6 nm diameter. d) Raman scattering experiments performed on pristine MWCNTs (red), untreated cell cytoplasm as a control (green), and the cytoplasm of a 48 h MWCNT-treated melanoma cell (black). The spectra of pristine MWCNTs display the typical fingerprints expected for MWCNTs indicated as D, G, and G'. These peaks specific of MWCNTs that are also observed in the intracellular spectrum obtained from MWCNT-treated cells (black) together with characteristic peaks that correspond to cellular proteins, confirm the presence of cytoplasmic MWCNTs.

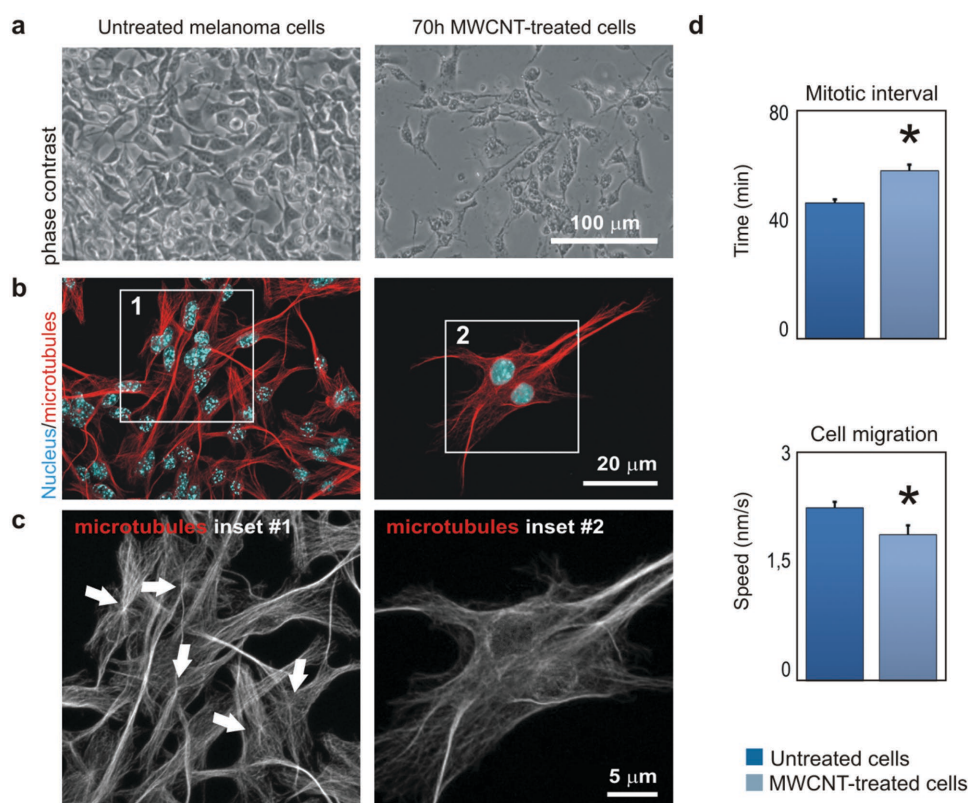


Figure 3. MWCNTs display antineoplastic effects in vitro. a) Phase contrast image of control melanoma cells and MWCNT-treated cultures exposed to $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ MWCNT for 70 h. A significantly decreased cell population together with characteristic cytotoxic features is evident in MWCNT-treated cells. b) Confocal microscopy projection images of melanoma cells displaying labeled nuclei (blue channel) and microtubules (red channel). MWCNT-treated cells (right) are larger in size, and display a poorly organized microtubule network. c) High magnification of the microtubule cytoskeleton networks shown in Figure 1b. Untreated melanoma cells (inset #1) display an evident microtubule radial organization with visible centrosomes in most cells (arrows). MWCNT-treated cells (inset #2) display a disorganized microtubule network with no observable centrosomes. d) MWCNT-treated cells have statistically longer proliferation cycles (metaphase to telophase) ($t = 4.088$; $n = 270$; confidence level 99.9%) and slower migration speeds ($t = 2.4$; $n = 176$; confidence level 98%).

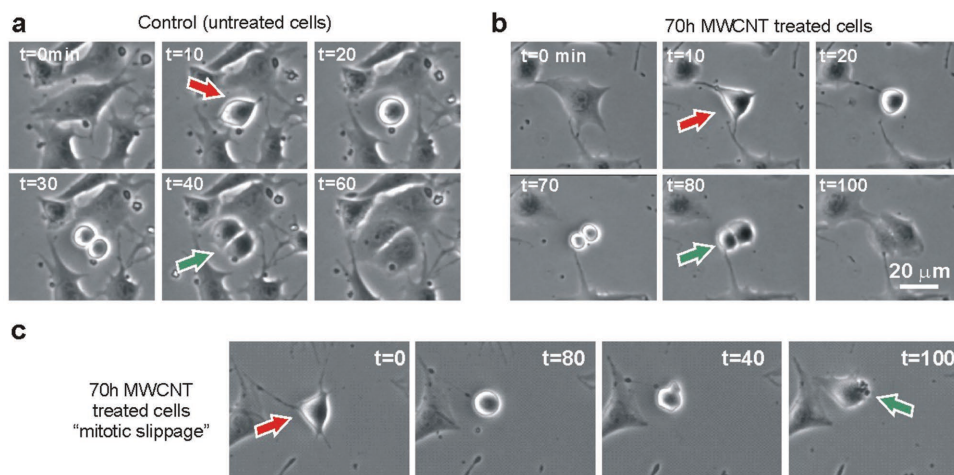


Figure 4. MWCNTs interfere with malignant melanoma cell proliferation in vitro. a) Time-lapse photograms of a representative melanoma cell mitotic cycle, from metaphase (red arrow) to telophase (green arrow). Time point intervals are shown on the top of each image. b) Photograms of a representative MWCNT-treated cell mitotic cycle. Melanoma cells exposed to MWCNTs undergo significant delays in the cell division process often resolving in asymmetric cell divisions. These images correspond to Video S1 (Supporting Information). c) MWCNT-treated cell mitotic cycle photograms. This cell division exit bypasses the G2 mitotic arrest by a mechanism known as "mitotic slippage." This abnormal mitotic exit leads to larger cell sizes and polyploidies as observed in MWCNT-treated cultures. This drug resistance mechanism resulting in polyploidy is frequently employed by malignant cancer cells exposed to microtubule stabilizing drugs such as paclitaxel. These images correspond to Video S2 (Supporting Information).

MWCNT-treated cells (Figure 3d). In conclusion, these investigations show the susceptibility of malignant melanoma cells to the intrinsic MWCNTs antineoplastic effect in vitro.

2.2. Intracellular MWCNTs Inhibit Melanoma Tumor Progression In Vivo

Many studies fail at the point of validating results in vivo, for solid tumors are not just disorganized masses of dividing cells that develop in different tissues. On the contrary, tumors are complex cellular structures that resemble abnormal organs, constituted of closely interrelated multiple cell types and extracellular matrix components, continuously undergoing local tissue remodelling processes to promote malignancy compromising the host tissue.^[30,31] As a tumor model, B16-F10 cells generate solid melanoma cell masses upon transplantation in the interscapular subcutaneous region of neonate mice. These tumors typically developed in 5–10 d displaying standard malignant melanoma aggressive features such as (i) a high mitotic rate, (ii) intratumoral necrotic foci, (iii) neo-vasculature development, (iv) expansive growth edges and infiltration of surrounding tissues -namely fat, muscle and peripheral nerves,

and (v) a significant inflammatory response, among others (Figure S1, Supporting Information).

To investigate the effect of MWCNTs in vivo, we have performed two different approaches. Our first method, aiming to reduce to a maximum natural variability and inherent noise of the in vivo system, consisted on a “Trojan-horse approach” where B16-F10 cells containing cytoplasmic MWCNTs were transplanted to generate solid tumors. MWCNT- cell loading was performed in vitro, with permissive dosages of MWCNTs ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$) for 48 h before transplantation. These dosages and incubation times are sufficient to allow MWCNTs translocation into the cells^[11,32] (Figure 1, Figure S1, Supporting Information), producing no detectable lethality *ex vivo* (Figure S2, Supporting Information). To ensure that control tumors developed under virtually identical conditions, littermates were simultaneously transplanted with untreated melanoma cells. The evaluation of the melanoma tumors 6 d post-transplant confirmed 60% smaller tumoral well-defined masses, displaying a solid pseudo-papillary pattern and a conspicuous acantholysis in tumors where melanoma cells had been exposed to MWCNTs (Figure 5). These results are highly indicative of the intrinsic anti-tumoral nature of MWCNTs in vivo.

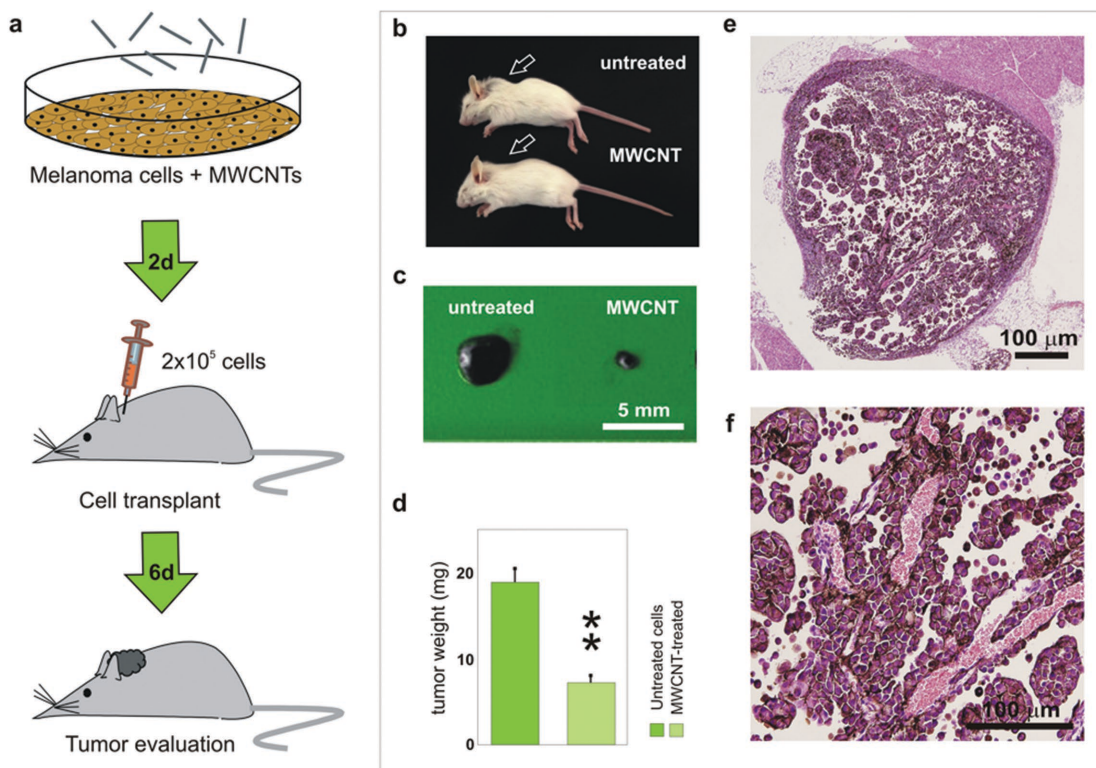


Figure 5. Antineoplastic effect of MWCNTs in solid tumors using the “Trojan Horse” approach. a) Diagram of the “Trojan-horse” approach. A total of 2×10^5 malignant melanoma cells pre-incubated with $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ of MWCNTs or untreated controls were transplanted into host mice. Tumors were allowed to grow for 6 d before evaluation. b) Representative mouse littermates used for the experiment, MWCNT-treated melanoma cells produce smaller tumors (arrows) than control untreated cells. c) Representative solid melanoma tumoral masses. d) Statistical analysis of the antineoplastic effect of intracellular MWCNTs. The average tumoral mass weight was significantly smaller when melanoma cells were pre-treated with MWCNTs ($t = 5.38$; $n = 77$; confidence level $>99.9\%$). e) Hematoxylin-eosin section of tumor displaying a non-infiltrating tumoral cell mass of pigmented epithelial melanoma cells typically packed into small well-defined masses, presenting a solid pseudo-papillary pattern and acantholysis (loss of intercellular connections) around blood vessels. f) Detail of the acantholysis surrounding small blood vessels loaded with visible erythrocytes.

2.3. Single Intratumoral Injections of MWCNTs Produce Significant Antineoplastic Effects in 96 h

There are pros and cons of the Trojan-horse approach that must be objectively taken into account. On one hand, this method circumvents the tumor targeting delivery problem, avoiding the possible interference with the tumor micro-environment^[31] while guaranteeing that most of the malignant cancer cells of the tumor mass are carriers of MWCNTs. But, on the other hand, and despite we have not observed significant cell survival differences in vitro at these dosages (Figure S2, Supporting Information), there is no way to guarantee that all the MWCNT-treated cells are fully viable hours after transplantation. Therefore, in order to get a picture closer to the real situation, we performed a second set of experiments consisting of a single injection of MWCNTs directly on the melanoma tumors (Figure 6). This method, although much more susceptible to biological artifacts and variables, provides direct evidence of the intrinsic anti-tumoral effect of MWCNTs in vivo. For the study, we generated solid melanoma tumors that were allowed to grow for 8 d before intratumoral injection with either, serum-functionalized MWCNTs, or the MWCNT resuspension medium as a control. These intratumoral injection experiments

were performed systematically in total population of more than 200 mice. The quantification and evaluation of the tumors carried out 4 d post-treatment, revealed how single intratumoral injections of 2 μ g MWCNTs produced remarkable anti-tumoral effects, resulting in final tumor masses 27% smaller than those observed in untreated controls (Figure 6b–d). Examination of the tumoral tissues revealed an intense peritumoral inflammatory infiltrate, multifocal coagulation necrosis, accompanied by carbon black deposits intermingling with ghost tumoral cells displaying karyolysis, i.e., the destruction of the nucleus of the cells (Figure 6e–g). In summary, the two studies using different strategies reveal that MWCNTs display intrinsic anti-tumoral effects in vivo, inhibiting tumor development with no aids such as accompanying drugs or interference nucleic acids. MWCNTs can significantly hinder tumor cell proliferation and spreading, preventing the growth of malignant tumor masses in vivo.

2.4. MWCNTs Display Antineoplastic Effects in Paclitaxel Resistant Melanoma Cells

In the MWCNT-microtubule interaction model proposed on previous research^[11,26] (Figure 1), MWCNTs intermingle with

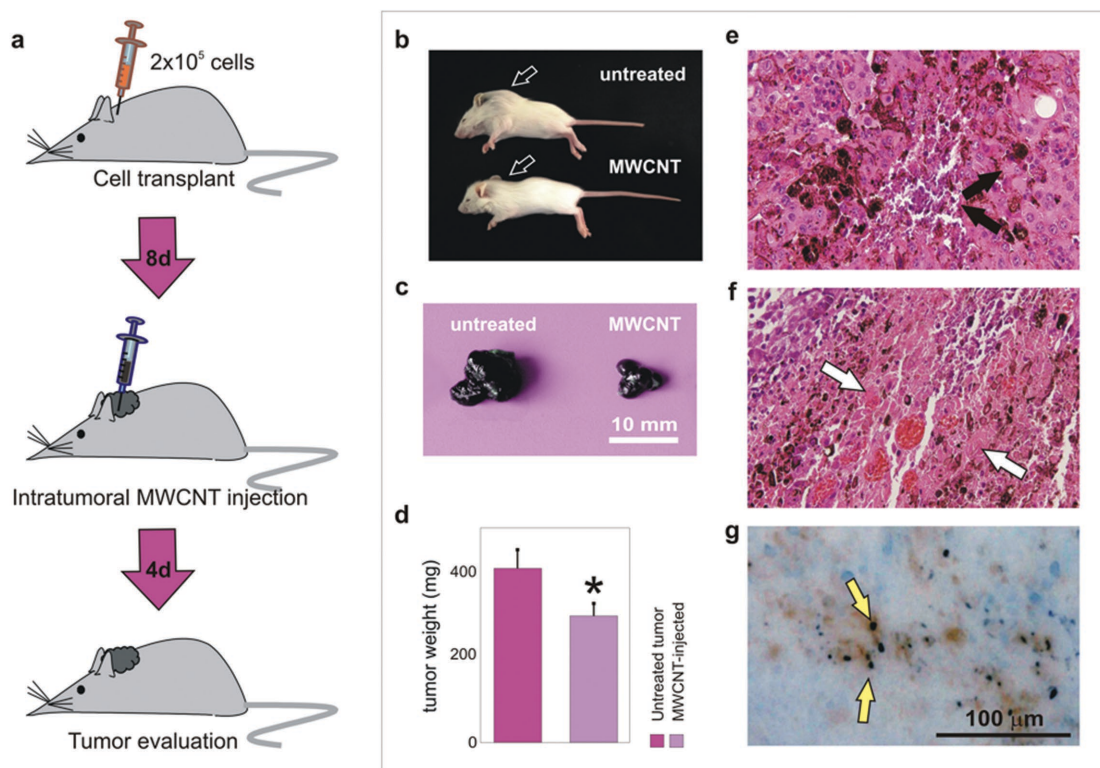


Figure 6. Antineoplastic effect of MWCNTs in solid tumors. a) Diagram of the intratumoral MWCNTs injection approach. A total of 2×10^5 melanoma cells were transplanted per mouse as described. Allotransplants were allowed to grow for 8 d before intratumoral MWCNTs injection. Solid melanomas were evaluated 4 d post-MWCNTs treatment. b) Representative mouse littermates used for the experiment. MWCNT-injected mice display smaller tumors than controls (arrows). c) Representative solid melanoma tumoral masses. d) Statistical analysis of the effect of single MWCNTs intratumoral injections. The average tumoral size was significantly smaller in MWCNTs treated tumors ($t = 1.85$; $n = 161$; confidence level = 95%). e) Hematoxylin-eosin section of MWCNT-injected melanoma tumors. Circumscribed tumoral masses displayed an intense peritumoral inflammatory infiltrate, multifocal necrosis that displayed dystrophic calcification, and carbon black deposits that were often intermingling with melanin in pigmented cells. f) Detail of Figure 3e. Brown pigmented epithelial cells intermingle with areas of coagulation necrosis (black arrow) and ghost cells displaying karyolysis (white arrows) in the tumor. g) Intratumoral MWCNTs black-carbon deposits (yellow arrows).

tubulin protofilaments associating along the lateral aspect of these polymers where structural studies and theoretical calculations show that the tubulin contacts are weaker, being mostly electrostatic.^[20,23] The theory underlying these results is that MWCNTs produce a scaffolding effect on microtubules that interferes with the dynamic instability that microtubules require during cell proliferation and migration.^[19] Our results serve to hypothesize that this MWCNTs interaction with microtubules is likely to be compatible—and complementary—to that of traditional microtubule dynamic-interfering agents. These drugs, namely, taxanes (paclitaxel, docetaxel, and cabazitaxel), promote microtubule stabilization inhibiting the disassembly of the tubulin polymer, binding to a lateral region localized in the polymerized β -tubulin molecule.^[33] In malignant cancer cells, this small structural interaction pocket is subjected to different mutations and post-translational changes that result in resistance to chemotherapy.^[34] To validate our MWCNT–microtubule interaction model, we complemented these results testing the MWCNT anti-tumoral effect on paclitaxel-resistant tumors. For the study, we treated cultures of melanoma cells with 40 μ M paclitaxel, killing most cells in the culture (Figure 7a, Figure S3, Supporting Information). Four weeks after the original treatment, the few surviving cell colonies were isolated and amplified in vitro (Figure 7b). These resistant cells were finally transplanted to generate solid tumors following the above protocol. As hypothesized, paclitaxel-resistant melanoma tumors were also 45% smaller after one single injection treatment with 2 μ g of MWCNTs (Figure 7c). These results suggest a significant adjuvant effect of MWCNTs on paclitaxel-resistant tumors.

3. Conclusion

Here, we demonstrate how MWCNTs have intrinsic antineoplastic properties, triggering anti-proliferative and cytotoxic effects in highly aggressive recurrent and heterogeneous neoplasias such as malignant melanomas very difficult to treat with conventional chemotherapies such as paclitaxel.^[29] These results serve to conjecture that MWCNTs can represent a new ground-breaking type of synthetic microtubule-stabilizing agents that could be used as adjuvant or neoadjuvant treatments to enhance the effect of the traditional tubulin binding chemotherapies, preventing drug resistance in cancer cells. In addition, MWCNTs might also have a “spin-off effect” eliminating the tumoral stromal cells that sustain cancer cell growth, invasion, and metastasis, displaying additional attractive therapeutic advantages, since destroying the supporting cells in the tumor is likely to reduce the risk of resistance and recurrence.^[31] Our data, together with former interesting studies that suggest other nanomaterials could also have important anticancer effects^[35–38] pioneer radically new strategies in the design of synthetic microtubule-stabilizing agents for cancer treatment.

4. Experimental Section

MWCNTs Characterization, Functionalization, and Dispersion: MWCNTs were synthesized following the catalytic Chemical Vapour Deposition (CVD) method as previously described.^[39] The characterization of

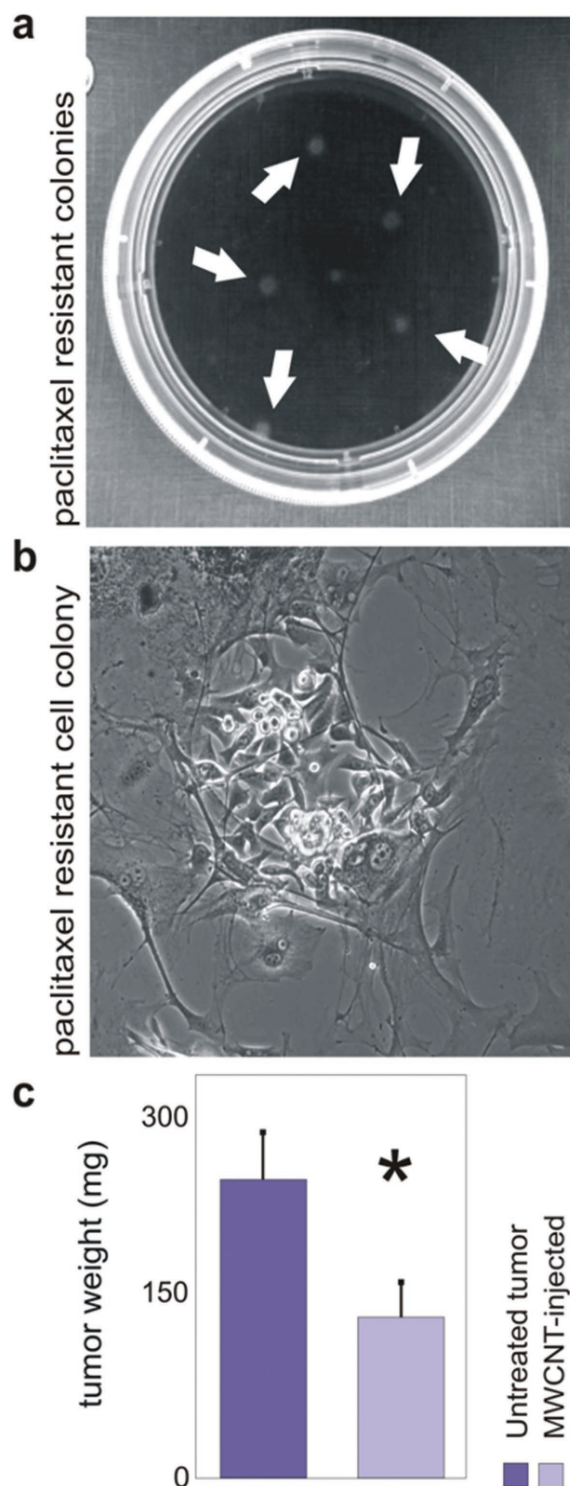


Figure 7. MWCNT adjuvant effect on paclitaxel resistant cells in vivo. a) Surviving paclitaxel-resistant melanoma cell colonies four weeks after a 4 d paclitaxel cytotoxic treatment. b) Phase contrast image of a single paclitaxel-resistant cell colony before cellular amplification. c) Statistical analysis of the effect of MWCNTs single injections in tumors generated with paclitaxel-resistant melanoma cells. The average final tumoral size was significantly smaller in tumors treated with MWCNTs ($t = 1.81$; $n = 74$ confidence level = 95%).

the as-produced MWCNTs can be found in Figure S4 (Supporting Information) and can be complemented with previous reports.^[11] The unpolarized Raman spectra were taken at room temperature with a Horiba T64000 triple spectrometer in the backscattering geometry, using the 514 nm line of a Coherent Innova Spectrum 70C Ar⁺-Kr⁺ laser and a nitrogen cooled CCD (Jobin-Yvon Symphony) coupled to a confocal microscope for detection. The laser beam was focused down to 1 μm spot with a 100 \times objective and kept the power on the sample below 2 mW to avoid laser-heating effects on the probed material and the concomitant softening of the observed Raman peaks. MWCNTs produce a characteristic Raman spectrum distinguishable from the SWCNT spectrum. The radial breathing modes (RBM), a Raman feature associated to the inner diameter, are not common and can only sometimes be observed when a good resonance condition is established. The RBM signal from large diameter tubes is usually too weak to be observable and the ensemble average of inner tube diameter broadens the signal. The intracellular Raman spectra were obtained in fixed cells focusing the laser beam in a cytoplasmic Z position at 1–5 μm from the cell basement. The as-produced MWCNTs were resuspended in standard tissue culture medium containing serum after repeated cycles of vortex mixing followed by mild sonication. The MWCNT concentration was quantified by optical absorption at 550 nm. A 0.2 mg mL⁻¹ MWCNTs stock solution was prepared to be diluted in standard culture medium to the indicated final working solution.

Cell Culture: B16-F10 murine malignant melanoma cells (ATCC CRL-6475) were cultured in Iscove's Dulbecco's modified medium 10% serum containing antibiotics. These cells, as most malignant melanomas, are genetically heterogeneous, highly metastatic, display an aggressive nature, and are difficult to treat due to resistance.^[40] Paclitaxel-resistant melanoma cell colonies were observed four weeks after a 4 d paclitaxel cytotoxic treatment. These paclitaxel-resistant cell colonies were amplified in vitro to generate paclitaxel-resistant cultures that were used for allotransplantation.

Solid Melanoma Tumor Growth Studies: All animal experimentation procedures were performed humanely, according to EU legislation following the principle of the "Three Rs," to Replace, Reduce, and Refine the use of animals. Tumorigenesis was induced by subcutaneous transplantation of a total of 2×10^5 B16-F10 melanoma cells in 10 μL of IMDM 10% serum. The under-developed immune system in neonate mice,^[41] together with the growth factor and hormonal conditions in their tissues ensure a perfect environment to support solid pigmented tumors, which are developed in 5–10 d. In all the experimental approaches, littermates were injected in parallel to controls. This allowed to observe each litter as a single experiment by itself. In the Trojan horse approach, cells were incubated during 48 h with 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of MWCNTs added to the tissue culture medium. Cell viability and cell cycle analysis were validated for each transplant using the trypan blue exclusion assay. Tumors were allowed to grow for 6 d before analysis. For the intratumoral injection approach, solid melanomas were allowed to grow for 9 d before injection directly in the tumor masses of 2 μg of MWCNTs resuspended in a volume of 10 μL of culture medium. Control littermates bearing identical tumors were injected with the resuspension medium. Tumors were analyzed 3 d post injection. In both experimental approaches, tumor masses were carefully dissected, weighed, fixed, and dehydrated for paraffin sectioning, hematoxylin-eosin staining and further analysis. Histological analysis was carried out in 4% formalin fixed tissues, buffered and dehydrated for paraffin sectioning and further hematoxylin-eosin staining for analysis. Carbon aggregates shown in Figure 6g were revealed in paraffin tissue sections treated with hydrogen peroxide to remove melanin.

Statistical Analysis: A *t*-test statistical analysis was carried out to evaluate the significance of results. The confidence level and total number of events included in the study are indicated for each statistical analysis. Quantitative results are expressed as mean values with their corresponding standard deviation error bars.

Flow Cytometry: It was used to perform quantitative and qualitative analysis of the total DNA content per cell, in $\approx 10,000$ cells per condition. This allows the simultaneous determination of the percentages of cells

at each stage of the cell cycle, and the percentage of apoptotic cells. Flow cytometry was performed on a suspension of fixed cells stained with Hoechst dyes (Bisbenzimidazole) using a Becton Dickinson FACS Cantoll equipment. Data were analyzed using the FACS Diva software (Becton Dickinson, NJ, USA).

Time-Lapse Video Microscopy, Immunostaining, and Confocal Microscopy Imaging: Time-lapse films were performed during 12 h in a Nikon Eclipse Ti-live-cell station. Videos S1–S2 (Supporting Information) were obtained at 15 min/frame using a 10 \times Nikon N.A. 0.45. Quantification analysis was performed with the NIS-Elements software. Immunostaining was performed in cells were fixed in 4% paraformaldehyde as described elsewhere.^[11] The anti- α -tubulin (B512) (Sigma-Aldrich) was combined with a secondary goat anti-mouse IgG antibody conjugated with Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Invitrogen). Actin was stained with phalloidin-tetramethylrhodamine B isothiocyanate (Sigma-Aldrich) and DNA (nucleus and chromosomes) with Hoechst dye (Sigma-Aldrich). Confocal microscopy images were obtained with a Nikon A1R confocal microscope. All confocal cell images are pseudo-colored.

Supporting Information

Supporting Information is available from the Wiley Online Library or from the author.

Acknowledgements

The authors thank Dr. E. Flahaut for providing the MWCNTs. The authors are grateful to the Nikon A1R Laser Microscopy Unit of the IDIVAL Institute for the electron microscopy and confocal/time-lapse microscopy, and to M. Aramburu for her help. This work was supported by the Spanish MINECO and European Union FEDER under Projects ref. PI13/01074 (AES 2013) and MAT2012-38664-C02-01. The authors especially thank the Fundación Eugenio Rodríguez Pascual (ref. "Ayudas de investigación" 2014).

Received: September 17, 2015

Revised: December 19, 2015

Published online:

- [1] M. F. L. De Volder, S. H. Tawfik, R. H. Baughman, A. J. Hart, *Science* **2013**, 339, 535.
- [2] M. Adeli, R. Soleymann, Z. Beiranvand, F. Madani, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, 5231.
- [3] M. Das, S. R. Datir, R. P. Singh, S. Jain, *Mol. Pharm.* **2013**, 10, 2543.
- [4] R. Krajcik, A. Jung, A. Hirsch, W. Neuhuber, O. Zolk, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, 369, 595.
- [5] S. Foillard, G. Zuber, E. Doris, *Nanoscale* **2011**, 3, 1461.
- [6] K. Kostarelos, A. Bianco, M. Prato, *Nat. Nanotechnol.* **2009**, 4, 627.
- [7] J. J. Mulvey, C. H. Villa, M. R. McDevitt, F. E. Escorcia, E. Casey, D. A. Scheinberg, *Nat. Nanotechnol.* **2013**, 8, 763.
- [8] A. A. Bhirde, V. Patel, J. Gavard, G. Zhang, A. A. Sousa, A. Masedunskas, R. D. Leapman, R. Weigert, J. S. Gutkind, J. F. Rusling, *ACS Nano* **2010**, 3, 307.
- [9] H. Ali-Boucetta, K. Kostarelos, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2013**, 65, 2111.
- [10] B. R. Smith, E. E. B. Ghosn, H. Rallapalli, J. A. Prescher, T. Larson, L. A. Herzenberg, S. S. Gambhir, *Nat. Nanotechnol.* **2014**, 9, 481.
- [11] L. Rodriguez-Fernandez, R. Valiente, J. Gonzalez, J. C. Villegas, M. L. Fanarraga, *ACS Nano* **2012**, 6, 6614.
- [12] L. M. Sargent, A. F. Hubbs, S. H. Young, M. L. Kashon, C. Z. Dinu, J. L. Salisbury, S. A. Benkovic, D. T. Lowry, A. R. Murray, E. R. Kisin,

- K. J. Siegrist, L. Battelli, J. Mastovich, J. L. Sturgeon, K. L. Bunker, A. A. Shvedova, S. H. Reynolds, *Mutat. Res., Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **2012**, 745, 28.
- [13] L. García-Hevia, R. Valiente, J. L. Fernandez-Luna, E. Flahaut, L. Rodríguez-Fernandez, J. C. Villegas, J. Gonzalez, M. L. Fanarraga, *Adv. Healthcare Mater.* **2015**, 4, 1640.
- [14] Y.-Y. Guo, J. Zhang, Y.-F. Zheng, J. Yang, X.-Q. Zhu, *Mutat. Res.* **2011**, 721, 184.
- [15] L. Ju, G. Zhang, X. Zhang, Z. Jia, X. Gao, Y. Jiang, C. Yan, P. J. Duerksen-Hughes, F. F. Chen, H. Li, X. Zhu, J. Yang, *PLoS One* **2014**, 9, DOI: 10.1371/journal.pone.0084974.
- [16] L. García-Hevia, R. Valiente, J. González, J. L. Fernández-Luna, J. C. Villegas, M. L. Fanarraga, *Curr. Pharm. Des.* **2015**, 21, 1920.
- [17] B. N. Snyder-Talkington, D. Schwegler-Berry, V. Castranova, Y. Qian, N. L. Guo, *Part. Fibre Toxicol.* **2013**, 10, 35.
- [18] R. K. Srivastava, A. B. Pant, M. P. Kashyap, V. Kumar, M. Lohani, L. Jonas, Q. Rahman, *Nanotoxicology* **2011**, 5, 195.
- [19] M. A. Jordan, L. Wilson, *Curr. Opin. Cell Biol.* **1998**, 10, 123.
- [20] E. Nogales, M. Whittaker, R. A. Milligan, K. H. Downing, *Cell* **1999**, 96, 79.
- [21] F. Pampaloni, E. L. Florin, *Trends Biotechnol.* **2008**, 26, 302.
- [22] P. A. Williams, S. J. Papadakis, A. M. Patel, M. R. Falvo, S. Washburn, R. Superfine, *Phys. Rev. Lett.* **2002**, 89, 255502.
- [23] V. VanBuren, D. J. Odde, L. Cassimeris, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 6035.
- [24] P. J. de Pablo, I. A. T. Schaap, F. C. MacKintosh, C. F. Schmidt, *Phys. Rev. Lett.* **2003**, 91, 098101.
- [25] T. Mitchison, M. Kirschner, *Nature* **1984**, 312, 237.
- [26] C. Z. Dinu, S. S. Bale, G. Zhu, J. S. Dordick, *Small* **2009**, 5, 310.
- [27] K. J. Siegrist, S. H. Reynolds, M. L. Kashon, D. T. Lowry, C. Dong, A. F. Hubbs, S.-H. Young, J. L. Salisbury, D. W. Porter, S. A. Benkovic, M. McCawley, M. J. Keane, J. T. Mastovich, K. L. Bunker, L. G. Cena, M. C. Sparrow, J. L. Sturgeon, C. Z. Dinu, L. M. Sargent, *Part. Fibre Toxicol.* **2014**, 11, 6.
- [28] L. Gonzalez, I. Decordier, M. Kirsch-Volders, *Biochem. Soc. Trans.* **2010**, 38, 1691.
- [29] P. Hersey, X. D. Zhang, *Nat. Rev. Cancer* **2001**, 1, 142.
- [30] M. Egeblad, E. S. Nakasone, Z. Werb, *Dev. Cell* **2010**, 18, 884.
- [31] D. Quail, J. Joyce, *Nat. Med.* **2013**, 19, 1423.
- [32] L. García-Hevia, R. Valiente, J. González, H. Terán, J. L. Fernández-Luna, J. C. Villegas, M. L. Fanarraga, *Curr. Pharm. Des.* **2015**, 21, 1920.
- [33] C. Alberti, *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **2009**, 13, 13.
- [34] G. a Orr, P. Verdier-Pinard, H. McDaid, S. B. Horwitz, *Oncogene* **2003**, 22, 7280.
- [35] C. Y. Tay, M. I. Setyawati, J. Xie, W. J. Parak, D. T. Leong, *Adv. Funct. Mater.* **2014**, 24, 5936.
- [36] C. Y. Tay, P. Cai, M. I. Setyawati, W. Fang, L. P. Tan, C. H. L. Hong, X. Chen, D. T. Leong, *Nano Lett.* **2014**, 14, 83.
- [37] M. I. Setyawati, C. Y. Tay, S. L. Chia, S. L. Goh, W. Fang, M. J. Neo, H. C. Chong, S. M. Tan, S. C. J. Loo, K. W. Ng, J. P. Xie, C. N. Ong, N. S. Tan, D. T. Leong, *Nat. Commun.* **2013**, 4, 1673.
- [38] M. I. Setyawati, C. Y. Tay, D. Docter, R. H. Stauber, D. T. Leong, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, 44, 8174.
- [39] E. Flahaut, C. Laurent, A. Peigney, *Carbon* **2005**, 43, 375.
- [40] G. Poste, J. Doll, I. R. Hart, I. J. Fidler, *Cancer Res.* **1980**, 40, 1636.
- [41] K. S. Landreth, *Hum. Exp. Toxicol.* **2002**, 21, 493.

Biomedical Physics & Engineering Express



PAPER

A fast, reliable and cost-effective method to generate tumor organs for therapy screening *in vivo*

Lorena García-Hevia, Fidel Fernández, Iñigo Casafont, Juan Carlos Villegas and Mónica L Fanarraga

Grupo de Nanomedicina, Universidad de Cantabria-IDIVAL, Facultad de Medicina, Herrera Oria, s/n, E-39011, Santander, Cantabria Spain

E-mail: fanarrag@unican.es**Keywords:** tissue engineering, cancer, animal model, allotransplantation, malignant melanoma, pharmacological screeningRECEIVED
24 September 2015REVISED
26 February 2016ACCEPTED FOR PUBLICATION
31 March 2016PUBLISHED
11 May 2016**Abstract**

Innovative anticancer treatments continuously require tissue bioengineering models to test novel therapies. The increasing number of developments based on nanotechnology for cancer therapy or theragnostics demand simple, reliable, fast and cost-effective cancer *in vivo* models for preclinical testing. However, despite the many tumor models available, very few reproduce the complex intratumoral cell-to-cell interactions as well as the accompanying systemic whole body effects resulting of the tumor organ metabolic, hormonal or growth factor activities, all having critical implications in the success of cancer therapies. Here we describe a reliable tumor model that can be easily reproduced to generate visible solid malignant melanoma tumor organs within a defined period of 5–10 days recapitulating the tumor stroma that is essential for cancer development. These models can be easily evaluated *in vivo* or by anatomo-pathological procedures. This method provides a fast, reproducible, reliable and cost-effective way to generate solid tumors for *in vivo* therapy, drug, nanomaterial or imaging probe evaluation, diagnostic or theragnostic screening and validation.

1. Introduction

Pharmacological and pharmacodynamic evaluation of new chemicals or nanomaterials in cancer requires inexpensive, reproducible and easily available models of study. Anticancer drug or nanomedicine effects are currently first investigated *in vitro*, in 2D and 3D cell culture systems grown from different cancer cells. These models provide a fast, reasonably efficient, inexpensive and reproducible ways of evaluating new anti-proliferative or cytotoxic therapies. However, there is ample bibliography that demonstrates how many *in vitro* validated chemicals do not behave as expected *in vivo*, when tested in real tumors. The main reason for this failure is the fact that real tumors are not just simple disorganized masses of tumoral cells [1]. Instead, tumors behave like real organs, interacting with the body releasing growth factor into the blood stream.

Tumors have a complex cellular organization where cancer cells are just a small proportion of all cells in the organ. Tumors consist of two basic components, the proliferating neoplastic parenchymal cells and the stroma. The parenchymal tumor cells

contribute to the growth and evolution of the tumor and are mostly located at the proliferating borders of solid neoplasms. The stroma includes the extracellular matrix components, the mesenchymal supporting cells, the cells of the vascular system and the cells of the immune system that infiltrate the cell mass. The stromal cells provide sustain and survival to cancer cells, actively participating in tumorigenesis and vasculogenesis. Therefore, the interactions between the parenchymal cancer cells and stromal components are critical in tumor growth and progression [1, 2].

Solid cancers are often characterized by intratumoral hypoxia and acidosis [3, 4]. Both play a fundamental role in tumor progression, resistance and are associated with a significantly increased risk of metastasis and patient mortality. Therefore, hypoxia and acidosis are highly desirable in tumor models for they are critical in every aspect of cancer biology and cancer therapy screening [3, 5].

Among the different tissue bioengineering approaches to model 3D cancer *in vitro* the most typical formats are (i) spheroids, (ii) cells cultured as multicellular aggregates or organoid cultures, and (iii) cells embedded in acellular tissue supports made of natural

or synthetic engineered matrices [6–8]. These approaches, applied in the study of pancreatic [9], prostate [10], squamous cell carcinoma [11], melanoma [12], or esophageal carcinoma [13] among many others, reproduce intratumoral hypoxia reasonably well [14].

A simple 3D multicellular culture model is the organotypic culture [15]. This system allows the *in vitro* growth of small samples of malignant tissues that replicate the original tumor cell types, at least during the initial culture steps [7]. However, as these explants grow *in vitro*, the cell population in the culture evolves and often macrophages and tumoral cells are the only two cell types well represented.

Transplantation models are a real alternative strategy for anticancer therapy screening. Cancer cell xenotransplantation is often performed in species such as the zebra fish or the chick embryonated eggs. However, although these systems are inexpensive and do not precise special bioethical requirements, they are quite laborious, and do not allow a sufficiently reproducible systematic study for accurate statistical evaluation of the therapy tested.

Mammalian models are more interesting from the therapeutic and pharmacological-point of view. Their physiology, body temperature, pharmacodynamics, toxicology, etc can all be reasonably extrapolated to humans. As with the above methods, there are also many alternatives, benefits and limitations for these model systems. The simplest model consists of transplantation of tumor tissues or cells into a host recipient of identical genetic background or strain. This type of transplant is known as allograft or syngeneic transplant. The main advantage of this experimental approach, typically performed in mice, is the presence of a normal host immune system that does not reject the tissue. A well-known example of this type of transplantation models is to produce melanoma tumors in C57BL/6J mice injecting B16F10 cells in intravenously. This system is interesting to induce a systemic tumorigenesis, most frequently triggering metastasis in lungs [16].

Paradoxically, the main advantage of this system is also the main disadvantage since cancer tissues and the recipient must share a common genetic background and thus, this model is limited to allograft transplants from the same species, i.e. murine tissue to murine host models, exhibiting a systematic rejection of human cancer cells.

Xenograph transplantation in mice is also possible. The host mice however, must have an impaired immune systems so the transplanted foreign cells or tissues are not rejected. These xenotransplantation techniques are typically performed in immunodepressed Athymic Nude [17–19] or also NOD SCID mice [20–23]. There are many advantages in these systems. First, (i) mice are mammalian cancer model systems, (ii) there is no rejection, (iii) and there is a tumor organ development. Moreover, these mice allow the transplantation of small cancer tissue pieces, thus

permitting the amplification of a replica of the whole tumoral microenvironment, including the different cell types existing in the tumor, growing malignant cell masses that are highly representative of the properties, progression and genetic variability of the particular cancer in study. These feature also allow the development of ‘avatar mice’ for *ad personam* drug testing [24]. But there are also disadvantages in these two models. The acquisition and housing of these mice is very expensive, in particular that of the Athymic Nude strain, since they are highly susceptible to opportunistic viral and bacterial infections. In addition, the immunodeficiency in these mice does not mimic the real tumor micro-environmental situation. Also, tumor growth in these models is slow, requiring 3–6 weeks [25].

Here we describe a new technique to develop tumor organs in murine neonate mice that has numerous advantages, namely (i) is a mammalian system where there is (ii) no rejection, (iii) a complete tumor organ development, (iv) is fully reproducible, (v) allows therapy (drugs or nanomedicines) testing, (vi) is fast (tumors develop in 6–15 days), (vii) easy and (viii) inexpensive. Other benefits include a complete tumor organ development that allows therapeutic interventions to investigate different treatment potentials, and clinical trial monitoring.

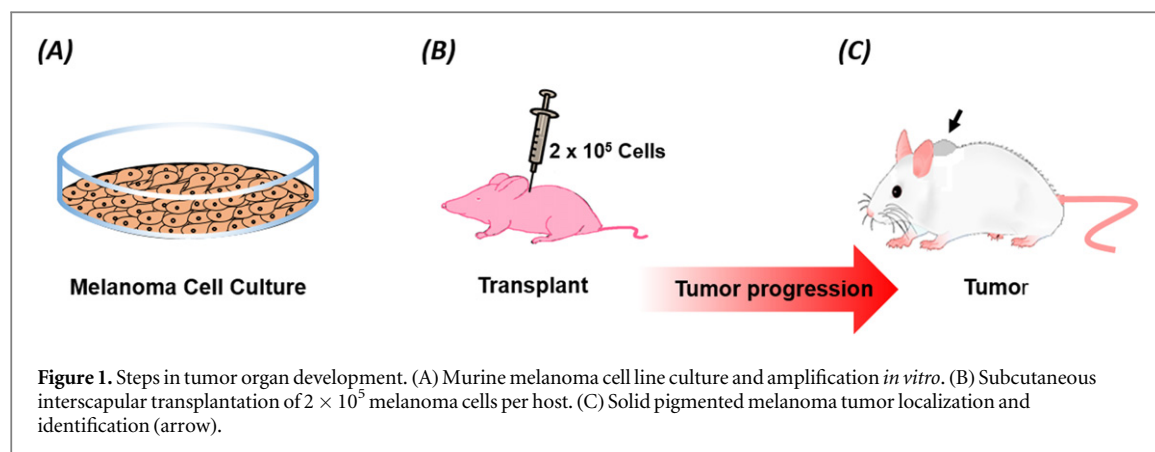
2. Materials and methods

2.1. Ethics statement

Animal work was conducted in accordance with the Guide for the ‘Care and Use of Laboratory Animals’ of the Spanish Ministry of Science, Research and Innovation. All methods were approved by The Committee on the Ethics of Animal Experiments of the University of Cantabria according to current EU legislation (RD 1201/2005). Next to that, all efforts were made to minimize the suffering of the mice. All animal experimentation procedures were performed humanely, according to EU legislation following the principle of the ‘Three Rs’, in the use of animals.

2.2. Cell culturing

B16F10 murine melanoma cells (ATCC® CRL-6475™) were cultured in 100 mm diameter culture Petri dishes filled with 10 ml of Iscove’s Modified Dulbecco’s Medium (IMDM) containing 10% fetal bovine serum and antibiotics (all from Life Technologies). The cells are grown in standard cell culture conditions, 37 °C 5% CO₂ in a humidified incubator and re-plated every 2 days to assure cell viability. Further cell line details or culturing conditions can be obtained at the ATCC web page (<http://lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-6475.aspx>).



2.3. Experimental preparation

CD1 mice are used as hosts for cell transplantation. Whole litters bearing 10–16 pups aged 2–9 (P2–P9, see the text) were used for the experiment. Mouse pups were transplanted with a total of 2×10^5 B16F10 murine malignant melanoma cells (ATCC[®] CRL-6475[™]) in a volume of 10 μ l of IMDM (Life Technologies) containing 10% serum and gentamicin subcutaneously (figure 1). Typically, a 70%–80% cell confluence Petri dish containing B16F10 melanoma cells was employed to transplant a single whole litter. The cell suspension was transitorily resuspended in 10 ml of complete tissue culture medium for cell counting in a Neubauer chamber. Cell numbers were adjusted to approximately 2×10^5 cells per ml. Aliquots of 1 ml were collected in 1.5 ml sterile centrifuge tubes that were maintained at 37 °C until the transplantation set u. is ready. Cells were finally collected by centrifugation in a volume of in 10 μ l of sterile tissue culture medium containing antibiotics.

2.4. Sample size and transplantation procedure

The number of pups per litter significantly conditions the speed of the pup development and thus, the final tumor size. This inherent *in vivo* artifact is reduced taking each litter as an independent experiment. All littermates should be injected simultaneously following identical procedures. A total of 10 μ l of melanoma cells is sterile tissue culture medium containing antibiotics is loaded in a 25–50 μ l Hamilton syringe for intra-scapular subcutaneous injection.

2.5. Therapy testing procedure

Animal monitoring should determine when the treatment should be applied (see the text and figures). Once tumors have developed, each litter should be divided in two halves for the drug/therapy testing study, using half of the litter as a control-i.e. injected with the control excipient used for the treatment in study-, and the other half as subject of the screening or testing treatment-i.e. drugs, nanomaterials, probes, etc- (figure 2). This procedure reduces to a maximum the inherent noised of the *in vivo* screening system,

reducing to a maximum the unspecific statistical variability.

2.6. Anatomo-pathology of the tumoral organs

Tumor growth evaluation is performed by anatomo-pathology. Mice should be sacrificed preserving the cervical region intact, for instances by anesthetic overdose. Tumor masses, localized in the interescapular region are carefully dissected. The final tumor size can be measured on the freshly dissociated tumors or fixed tissue (volume measurement or weight). Microscopic detailed analysis can be carried out in formaldehyde fixed tumors that can be routinely processed for paraffin embedding and sectioning and hematoxylin-eosin staining. Final tumor sizes can be statistically evaluated using a standard software, i.e. Sigma Plot 8.0 (Systat Software, Richmond, CA).

2.7. Electron microscopy

Tissue samples processed for electron microscopy were fixed with 3% glutaraldehyde in 0.12 M phosphate buffer, during 24 h, were washed in 0.12 M phosphate buffer, post-fixed in 2% buffered osmium tetroxide, dehydrated in a graded acetone series and embedded in Araldite. Semi-thin sections (1 μ m) were stained with 1% toluidine blue to assess the cells. Ultrathin sections, 70 nm thick, were obtained on an LKB ultramicrotome, stained with lead citrate and uranyl acetate and observed in a Jeol 1011 microscope.

3. Results

3.1. Tumor growth monitorization *in vivo*

The under-developed immune system of these host mice together the growth factor and hormonal conditions in their tissues ensure a perfect tumoral environment to support solid pigmented tumors that develop in 4–10 days (figure 3) [26]. The developing pigmented tumor masses can be easily monitored 2–4 days post-transplantation in live animals though the skin (figure 3). Black cell masses can be very easily identified 6–8 days post-transplant. At this time treatments such

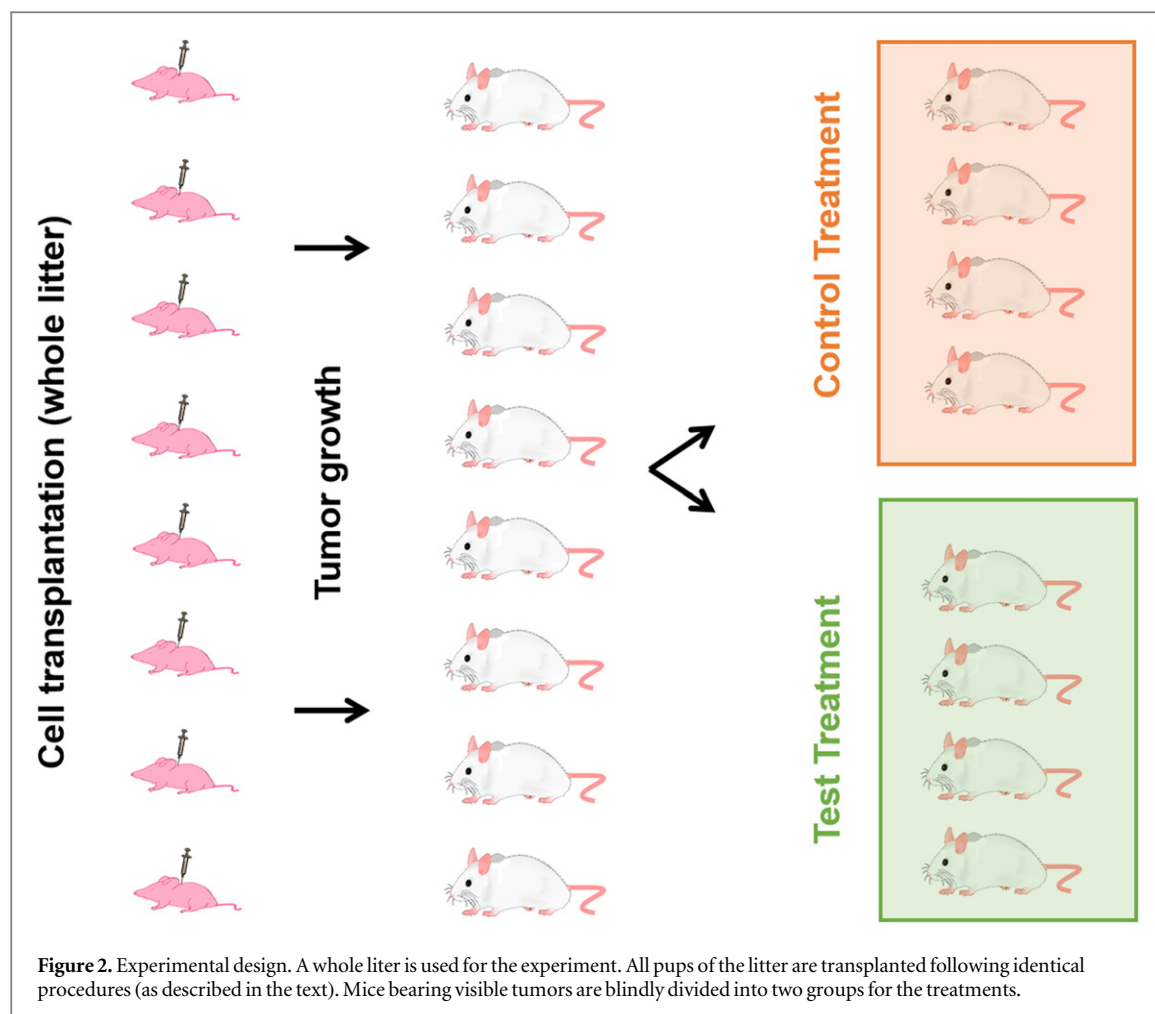


Figure 2. Experimental design. A whole litter is used for the experiment. All pups of the litter are transplanted following identical procedures (as described in the text). Mice bearing visible tumors are blindly divided into two groups for the treatments.

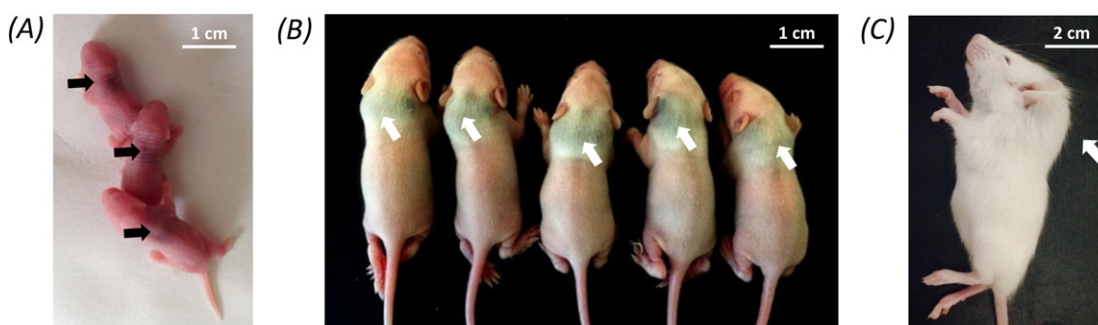


Figure 3. Development of the tumor organ. (A) Postnatal day 4 mice two days after transplant. Arrows point at the injection point. (B) Visible subcutaneous interescapular transplantation pigmented tumors in postnatal day 8 pups, 5 days post-transplant. Arrows indicate the localization of the tumor. This image demonstrates the high reproducibility of this tumor transplantation technique. (C) Postnatal 15 mouse bearing a solid melanoma tumor (arrow).

as intratumoral drug delivery can be easily performed. If the study requires larger tumors, solid melanoma masses can be allowed to grow for other 3–7 days (figure 3(C)). Black subcutaneous masses can be easily identified in life animals and after sacrifice for further tumor analysis (figure 4).

Tumoral organs can be allowed to grow for different time periods depending of the type of screening to be performed. However, as the host develops the immune system, the tumor growth rate diminishes,

achieving a final tumoral organ size of up to 500 mg. As a general rule, host mice do not develop cachexia. Therapy can be applied 5–14 days post-transplant depending on the experimental requirements, i.e. desired tumor size at treatment, or required final tumor size. A simple day-by-day direct monitorization of the tumoral mases can be performed for in real time for therapy testing. Tumor characterization and evaluation by conventional techniques can also be performed (i.e. ultrasonography).

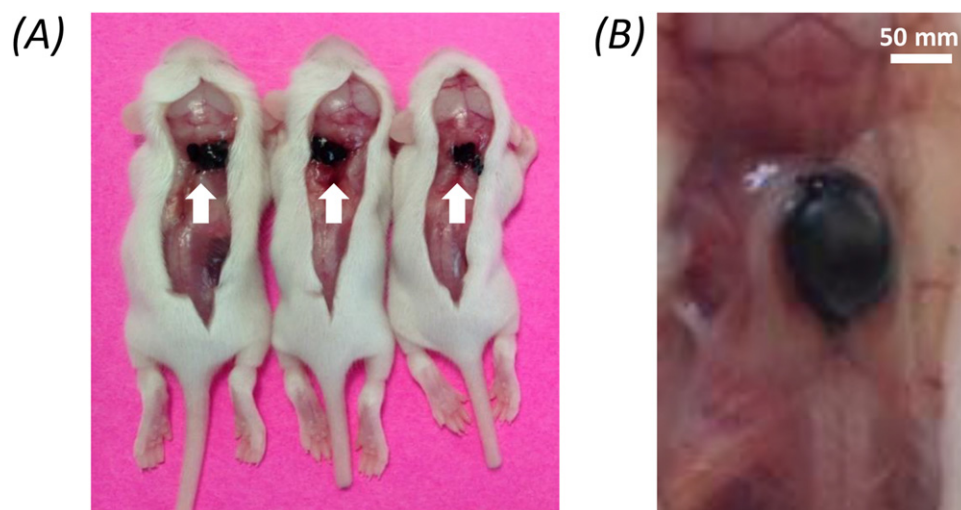


Figure 4. Macroscopic evaluation of the generated tumors. (A) This image shows the location and macroscopic characteristics of various melanoma tumors in 12 day old mice littermates (5 days post-transplant). Black pigmented tumors are easily identifiable for anatomic-pathological evaluation. The reproducibility of the technique is also patent. (B) Close up image of one of a melanoma tumor *in situ*. The tumor is generally encapsulated, well vascularized and can be easily dissected for further analysis (5 days post-transplant).

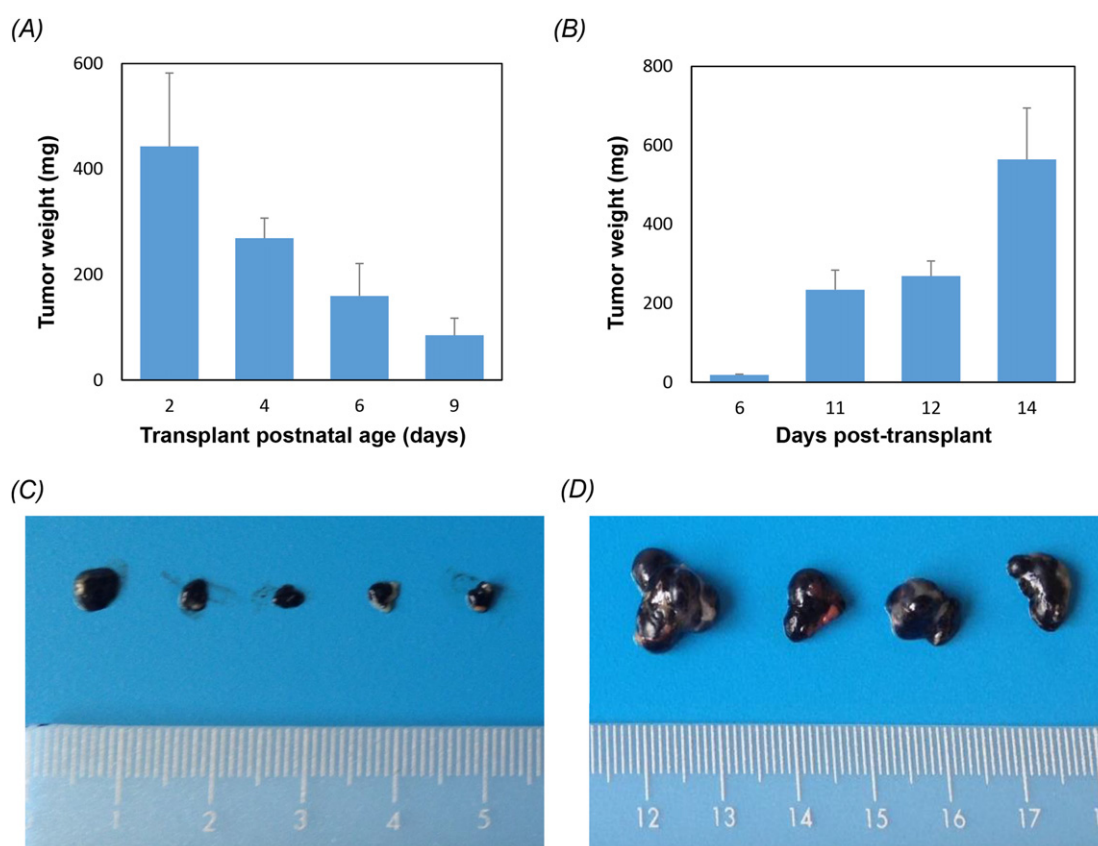


Figure 5. Experimental reproducibility. (A) This histogram represents the final melanoma tumor sizes in transplanted mice and the influence of host age at transplantation. Tumors were dissected 10 days post-transplantation and weighed. Mice transplanted at postnatal day 2 display significantly larger tumors than mice transplanted at older ages. Notice that tumor size variability is smaller in older mice. (B) Final tumor sizes in mice transplanted a postnatal day 4 allowed to develop for 6, 11, 12 and 14 days. These results indicate that 11–12 days post-transplant enhance the experimental reproducibility. (C) Representative tumor organ growth reproducibility in postnatal day 4 transplanted mice, processed 6 days post-transplant. (D) Tumor organ reproducibility in postnatal day 4 transplanted mice, processed 14 days post-transplant.

3.2. Anatomic-pathology of the tumoral organs

Transplantation of melanoma cells generate very similar solid pigmented melanoma tumors in all the pups of

the litter with a maximum degree of reproducibility (figure 3). Macroscopically these tumoral masses are generally well encapsulated, vascularized, and have

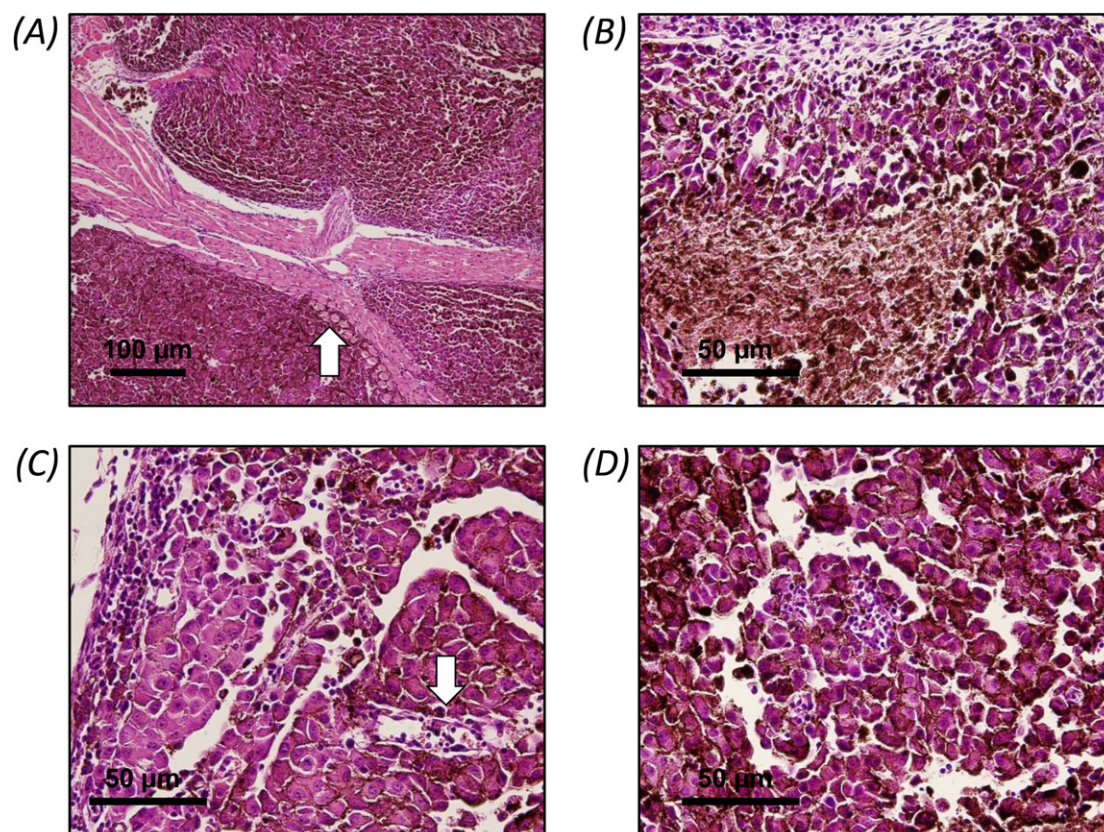


Figure 6. Microscopic anato-pathological characteristics the generated melanoma tumors. (A) Hematoxylin–eosin section of tumor displaying typical malignant tumoral features such as expansive tumor edges, and neovascularization. The transplanted cells occasionally develop infiltrating tumoral cell masses of pigmented epithelial melanoma cells (arrow). (B) Detail of the pigmented cell masses within the tumoral organ. (C) Detail of the acantholysis surrounding small blood vessels loaded with visible erythrocytes (arrow). (D) These tumors present a solid pseudo-papillary pattern and acantholysis (loss of intercellular connections). A significant inflammatory response, a high mitotic rate, intratumoral necrotic foci are also observed.

variable sizes depending on various key factors, namely (i) age at transplantation, and (ii) days that the tumoral mass is allowed to grow (figure 4). Tumoral organs can vary from 2–500 mm depending on these factors. Figure 5 shows the variability expected for the final tumoral masses according to these two factors. Histological examination of these tumors reveal cell masses constituted of well-organized and pigmented melanoma parenchymal cells that intermingle with multiple other cell types and extracellular matrix components (figure 6). Neovascularization of the tumor masses is also observed. These tumors display typical standard malignant melanoma aggressive features such as (i) a high mitotic rate, (ii) intratumoral necrotic foci, (iii) expansive growth edges and (iv) infiltration of surrounding tissues -namely fat, muscle and peripheral nerves-, (v) or a significant inflammatory response, among others (figures 6 and 7). Summarizing, these tumor organs are highly representative of naturally developing tumor organs and display classical hallmarks of cancer including sustained angiogenesis.

3.3. Versatility of the model

This tumor model system is highly versatile allowing the *in vivo* testing and validation of single treatments

of repeated dosages of different therapies, from drugs to engineered nanomaterials, different pre-treatments [27, 28], diagnostic probes such as quantum dots for tumor localization or magnetic nanomaterials for diagnosis, theragnostics therapies, etc. Moreover, these therapies can be applied by all possible routes including (i) intra-venous, (ii) intra-muscular, (iii) subcutaneous, (iv) oral, (v) intratumoral injection or by any other parenteral route, etc.

3.4. Reproducibility of the model

Reproducibility of the experimental conditions is generally the major handicap of *in vivo* therapy testing. This tumor models are highly reproducible compared to most 3D tumoral models that often produce tumor cell masses are not directly comparable in different individuals, mostly due to experimental artifacts resulting from complex technical approaches. This experimental variability does not allow to discriminate the effect of the therapy tested from that of the being investigated compared to that of the placebo or control. Figures 3–5 show the high degree of reproducibility of the system reducing to a minimum the inherent noise of these type of transplantation experiments.

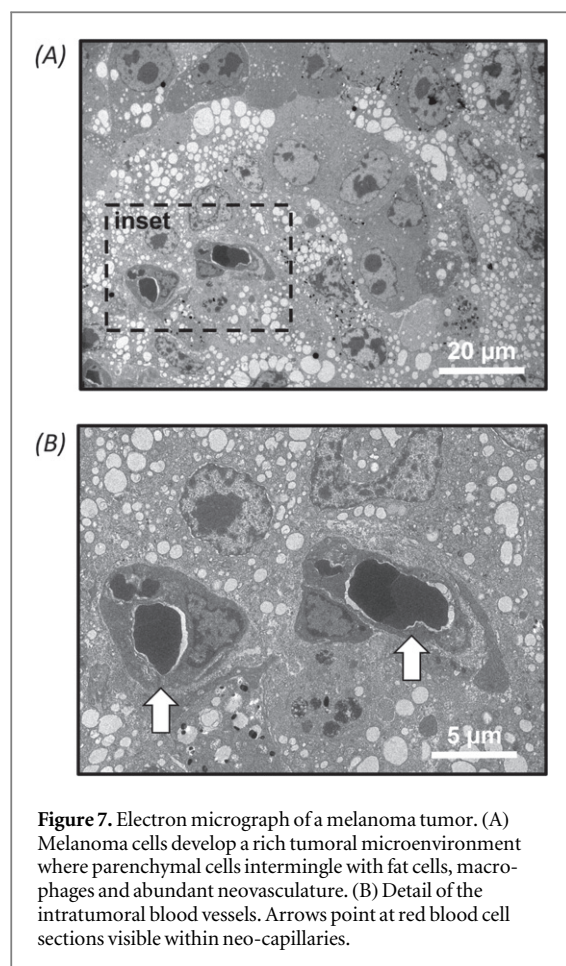


Figure 7. Electron micrograph of a melanoma tumor. (A) Melanoma cells develop a rich tumoral microenvironment where parenchymal cells intermingle with fat cells, macrophages and abundant neovasculation. (B) Detail of the intratumoral blood vessels. Arrows point at red blood cell sections visible within neo-capillaries.

4. Discussion

The urgent need for the development of simple, cost-effective and physiologically relevant models in cancer clinical trials has forced to develop many different experimental systems to reproduce tumoral conditions. As a first approach, preclinical drug testing typically performed *in vitro* is likely to produce meaningful results. However, as the assays and questions become more refined, tissue culture models cannot recapitulate many aspects of human cancers including the genesis, progression, and clinical course. Hence, *in vivo* cancer models displaying different degrees of sophistication must be used to test cancer therapeutics or diagnostic probes. Among these, the murine model is the most widely used tool.

There are many murine models currently available that replicate countless tumoral characteristics. At the present time, there are murine cancer models that can be developed ad hoc, on the basis of particular clinical trial or studies. Among these there are (i) genetic transgenic germline models, (ii) gene knock-outs and knock-ins, (iii) conditional or inducible cancer systems, (iv) models of insertional mutagenesis, (v) RNA interference cancer models, (vi) viral-mediated mutagenesis, (vii) treatment with chemical carcinogens, (viii) murine chimeras, etc. However, genetic mouse models are far too sophisticated, difficult to produce,

expensive and take months or years to developed, and thus result inaccessible for many laboratories.

The transplantation models discussed in the introduction of this manuscripts are more versatile for routine assays and, compared to genetic models, are low-cost for general therapy testing. However, while most of these systems can provide meaningful results for many drug or therapy aspects, most of these experimental models lack the degree of reproducibility necessary to perform a reliable statistical analyses. This study provides a new alternative model for preclinical drug testing *in vivo* that is reliable, cost-effective, reproducible and only takes a few days for the experimental setup to generate tumor organs for therapy screening *in vivo*.

5. Conclusion

The development of new therapies requires simple but reliable models for screening, ideally mammalian 3D multicellular models that can be easily monitored by untrained scientists to allow a fast preliminary evaluation of new compounds. Most mammalian *in vivo* systems require high tech skills that are often inexistent in most routine laboratories. Here we describe a mouse cell transplantation model for the study of cancer therapies that can be monitored by naked eye, can be treated with any putative therapy by any route, is fully reproducible and thus, is a highly convenient for most routine preclinical therapy testing assays, making *in vivo* therapy evaluation simple and efficient.

Acknowledgments

This work has been supported by the Spanish MINECO and European Union FEDER Funds under Projects ref. PI13/01074 (AES 2013). The authors have declared that no competing interests exist. We especially thank the IDIVAL for their support to LGH.

References

- [1] Egeblad M, Nakasone E S and Werb Z 2010 Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism *Dev. Cell* **18** 884–901
- [2] Whiteside T L 2008 The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth *Oncogene* **27** 5904–12
- [3] Semenza G L 2015 The hypoxic tumor microenvironment: a driving force for breast cancer progression *Biochim. Biophys. Acta* **1863** 382
- [4] Gillies R J, Verduzco D and Gatenby R A 2012 Evolutionary dynamics of carcinogenesis and why targeted therapy does not work *Nat. Rev. Cancer* **12** 487–93
- [5] Teicher B A 1994 Hypoxia and drug resistance *Cancer Metastasis Rev.* **13** 139–68
- [6] Unger C, Kramer N, Walzl A, Scherzer M, Hengstschläger M and Dolznig H 2014 Modeling human carcinomas: physiologically relevant 3D models to improve anti-cancer drug development *Adv. Drug Deliv. Rev.* **79–80** 50–67

- [7] Kimlin L C, Casagrande G and Virador V M 2013 In vitro three-dimensional (3D) models in cancer research: an update *Mol. Carcinog.* **52** 167–82
- [8] Leong D T and Ng K W 2014 Probing the relevance of 3D cancer models in nanomedicine research *Adv. Drug Deliv. Rev.* **79–80** 95–106
- [9] Boj S F et al 2014 Organoid models of human and mouse ductal pancreatic cancer *Cell* **160** 324
- [10] Galán-Malo P, Vela L, Gonzalo O, Calvo-Sanjuán R, Gracia-Fleta L, Naval J and Marzo I 2012 Cell fate after mitotic arrest in different tumor cells is determined by the balance between slippage and apoptotic threshold *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **258** 384–93
- [11] Jo M, Eastman B M, Webb D L, Stoletov K, Klemke R and Gonias S L 2010 Cell signaling by urokinase-type plasminogen activator receptor induces stem cell-like properties in breast cancer cells *Cancer Res.* **70** 8948–58
- [12] Santiago-Walker A, Li L, Haass N K and Herlyn M 2009 Melanocytes: from morphology to application *Skin Pharmacol. Physiol.* **22** 114–21
- [13] Grugan K D et al 2010 Fibroblast-secreted hepatocyte growth factor plays a functional role in esophageal squamous cell carcinoma invasion *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **107** 11026–31
- [14] Chia S L, Tay C Y, Setyawati M I and Leong D T 2015 Biomimicry 3D gastrointestinal spheroid platform for the assessment of toxicity and inflammatory effects of zinc oxide nanoparticles *Small* **11** 702–12
- [15] Shamir E R and Ewald A J 2014 Three-dimensional organotypic culture: experimental models of mammalian biology and disease *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15** 647–64
- [16] Setyawati M I et al 2013 Titanium dioxide nanomaterials cause endothelial cell leakiness by disrupting the homophilic interaction of VE-cadherin *Nat. Commun.* **4** 1673
- [17] Kelland L R 2004 ‘Of mice and men’: values and liabilities of the athymic nude mouse model in anticancer drug development *Eur. J. Cancer* **40** 827–36
- [18] Ahn S-H, Henderson Y, Kang Y, Chattopadhyay C, Holton P, Wang M, Briggs K and Clayman G L 2008 An orthotopic model of papillary thyroid carcinoma in athymic nude mice *Arch. Otolaryngol. Head. Neck Surg.* **134** 190–7
- [19] Tomayko M M and Reynolds C P 1989 Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice *Cancer Chemother. Pharmacol.* **24** 148–54
- [20] Shultz L D, Schweitzer P A, Christianson S W, Gott B, Schweitzer I B, Tennent B, McKenna S, Mobraaten L, Rajan T V and Greiner D L 1995 Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice *J. Immunol.* **154** 180–91
- [21] Ito M et al 2002 NOD/SCID/ γ cnul mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells *Blood* **100** 3175–82
- [22] Greiner D L, Hesselton R A and Shultz L D 1998 SCID mouse models of human stem cell engraftment *Stem Cells* **16** 166–77
- [23] Zhou Q, Facciponte J, Jin M, Shen Q and Lin Q 2014 Humanized NOD-SCID IL2rg^{-/-} mice as a preclinical model for cancer research and its potential use for individualized cancer therapies *Cancer Lett.* **344** 13–9
- [24] Garralda E et al 2014 Integrated next-generation sequencing and avatar mouse models for personalized cancer treatment *Clin. Cancer Res.* **20** 2476–84
- [25] Kyriazis A P, Dipersio L, Michael G J, Pesce A J and Stinnett J D 1978 Growth patterns and metastatic behavior of human tumors growing in athymic mice growth patterns and metastatic behavior of human tumors growing in *Cancer Res.* **38** 3186–90
- [26] Landreth K S Critical windows in development of the rodent immune system *Hum. Exp. Toxicol.* **21** 493–8
- [27] Peng X-H, Qian X, Mao H, Wang A Y, Chen Z G, Nie S and Shin D M 2008 Targeted magnetic iron oxide nanoparticles for tumor imaging and therapy *Int. J. Nanomedicine* **3** 311–21
- [28] Wang Y and Chen L 2011 Quantum dots, lighting up the research and development of nanomedicine *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* **7** 385–402

Nano-ZnO leads to tubulin microtubule assembly and actin bundling, triggering cytoskeletal catastrophe and cell necrosis.

Lorena García-Hevia, Rafael Valiente, Rosa Martín-Rodríguez, Carlos Renero-Lecuna, Jesús González, Lidia Rodríguez-Fernández, Fernando Aguado, Juan C. Villegas and Mónica L. Fanarraga

Nanoscale. 2016 Jun 7;8 (21):10963-73

[DOI: 10.1039/C6NR00391E](https://doi.org/10.1039/C6NR00391E)